

# ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOGEMATOLOGY

**Вторичные солидные опухоли у детей  
после аллогенной трансплантации  
костного мозга**

---

**Инфазивный мукормикоз  
у онкогематологических пациентов**

---

**Лечение рецидивов и резистентных  
форм лимфомы Ходжкина**

---

**Проточная цитометрия в диагностике  
и мониторинге минимальной  
остаточной болезни  
при множественной миеломе**

2

Журнал «Онкогематология» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

С 2006 года журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

С 2015 года электронная версия журнала представлена в ведущих российских и мировых электронных библиотеках, в том числе EBSCO.

В апреле 2017 г. принято решение о включении журнала в базу данных Scopus.

# ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

<http://oncohematology.abvpress.ru>

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Самочатова Елена Владимировна**, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный научный сотрудник отдела депрессий кроветворения, миелоидных лейкозов, редких и наследственных болезней ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

## ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

**Афанасьев Борис Владимирович**, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, директор Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, заведующий кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

**Птушкин Вадим Вадимович**, д.м.н., профессор, заместитель главного врача по гематологии ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы», заведующий отделом кооперированных исследований в гематологии/онкологии подростков и взрослых ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

## ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

**Румянцева Юлия Васильевна**, д.м.н., заведующая отделом исследования лимфопролиферативных заболеваний ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

## ПОМОЩНИК ОТВЕТСТВЕННОГО СЕКРЕТАРЯ

**Петрова Галина Дмитриевна**, к.м.н., научный сотрудник отделения интенсивной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

О С Н О В А Н В 2 0 0 5 Г .

Адрес редакции:  
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,  
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.  
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: abv@abvpress.ru  
www.abvpress.ru

Редактор Л.К. Мусатова  
Корректоры: Е.В. Маурина,  
Р.В. Журавлева  
Дизайн Е.В. Степанова  
Верстка Е.А. Прокофьева

Служба подписки и распространения  
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,  
base@abvpress.ru  
Руководитель проекта  
А.Г. Прилепская, +7 (965) 319-10-53,  
alla@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован  
в Федеральной службе по надзору  
в сфере связи, информационных технологий  
и массовых коммуникаций  
ПИ № ФС77-36928 от 21 июля 2009 г.

При полной или частичной  
перепечатке материалов ссылка  
на журнал «Онкогематология»  
обязательна.

Редакция не несет ответственности  
за содержание публикуемых  
рекламных материалов.

В статьях представлена точка  
зрения авторов, которая может  
не совпадать с мнением редакции.

ISSN 2413-4023 (Online)  
ISSN 1818-8346 (Print)  
Онкогематология. 2017. Том 12.  
№ 2. 1–96  
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017  
Подписной индекс в каталоге  
«Пресса России» — 42167  
Отпечатано в типографии  
ООО «Тверской Печатный Двор»  
Тираж 3000 экз.

<http://oncohematology.abvpress.ru>

2<sup>Том 12</sup>  
'17

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Алейникова Ольга Витальевна**, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Республики Беларусь, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» Минздрава Республики Беларусь, врач-гематолог высшей квалификационной категории (Минск, Республика Беларусь)

**Голенков Анатолий Константинович**, д.м.н., профессор, академик РАЕН, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. Н.Ф. Владимирского», главный гематолог Московской области (Москва, Россия)

**Дубровин Михаил Михайлович**, д.м.н., профессор, отдел ядерной медицины Детского исследовательского госпиталя Св. Иуды (Мемфис, США)

**Карачунский Александр Исаакович**, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора — директор института онкологии, радиологии и ядерной медицины ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

**Криволапов Юрий Александрович**, д.м.н., профессор, член панели патологов Европейской сети исследования лимфом, член Европейской рабочей группы исследования костного мозга, заведующий патологоанатомическим отделением клинической молекулярной морфологии Клиники им. Э.Э. Эйхвальда ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

**Менделеева Лариса Павловна**, д.м.н., заместитель генерального директора по науке и инновациям — директор НИИ гематологии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

**Минков М.Л.**, д.м.н., доцент, заведующий Клиникой педиатрии и подростковой медицины с отделением неонатологии больницы Rudolfstiftung (Вена, Австрия)

**Мякова Наталья Валерьевна**, д.м.н., профессор, заведующая отделением онкогематологии ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

**Никитин Евгений Александрович**, д.м.н., руководитель дневного стационара Городского гематологического центра ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы» (Москва, Россия)

**Паровичникова Елена Николаевна**, д.м.н., руководитель отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

**Пономарев Владимир Борисович**, д.м.н., отдел радиологии Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга (Нью-Йорк, США)

**Рукавицын Олег Анатольевич**, д.м.н., профессор, начальник Гематологического центра ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России, главный гематолог госпиталя (Москва, Россия)

**Усс Анатолий Леонидович**, д.м.н., профессор, главный гематолог Минздрава Республики Беларусь, член Комитета по трансплантологии Совета Европы и Европейской группы по трансплантации костного мозга, руководитель Республиканского центра гематологии и трансплантации костного мозга (Минск, Республика Беларусь)

**Фечина Лариса Геннадиевна**, заслуженный врач РФ, заместитель главного врача по онкологии и гематологии ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1», руководитель Центра детской онкологии и гематологии (Екатеринбург, Россия)

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

**Крыжановский Олег Игоревич**, к.м.н., руководитель программы лечения злокачественных гематологических заболеваний медицинского онкологического центра «Alta Bates» (Калифорния, США)

**Лукина Елена Алексеевна**, д.м.н., профессор, руководитель научно-клинического отделения редких заболеваний, ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии лейкозов и патологии эритронов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

**Поддубная Ирина Владимировна**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая кафедрой онкологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России на базе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Россиев Виктор Анатольевич**, к.м.н., врач высшей категории, заведующий гематологическим отделением ГБУЗ «Самарская областная клиническая больница им. М.И. Калинина» (Самара, Россия)

**Румянцев Александр Григорьевич**, д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, главный внештатный детский специалист-гематолог Минздрава России, член правления Союза педиатров (Москва, Россия)

**Румянцев Сергей Александрович**, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, проректор по стратегическому развитию, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, заведующий кафедрой трансляционной и регенеративной медицины ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Минобрнауки России (Москва, Россия)

**Талалаев Александр Гаврилович**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России на базе ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница», главный детский патологоанатом г. Москвы (Москва, Россия)

The journal "Oncohematology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

In 2006, journal was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Since 2015, the journal's electronic version has been available in the leading Russian and international electronic libraries, including EBSCO.

In April 2017, the decision was made to include the journal in the Scopus database.

# ONCOHEMATOLOGY

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

<http://oncohematology.abvpress.ru>

## EDITOR-IN-CHIEF

**Samochatova Elena V., MD, PhD, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Chief Researcher of Hematopoiesis depressions, myeloid leukemia, rare and hereditary diseases department in National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)**

## DEPUTIES OF EDITOR-IN-CHIEF

**Afanasiev Boris V., MD, PhD, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Director of Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Head of the Department of Hematology, Transfusion and Transplantation at Acad. I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)**

**Ptushkin Vadim V., MD, PhD, Professor, Deputy Chief Physician for hematology of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; Head of Department of Cooperated Research in Adolescents/Adults Hematology/Oncology National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)**

## EXECUTIVE SECRETARY

**Rumyantseva Yulia V., MD, PhD, Head of Department of Lymphoproliferative Diseases Studies in National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia, Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)**

## ASSISTANT OF EXECUTIVE SECRETARY

**Petrova Galina D., MD, PhD, Research Fellow in Department of Intensive Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)**

FOUNDED IN 2005

**2** Vol. 12  
**'17**

## Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,  
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Build. 15,  
Moscow, 115478.  
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: [abv@abvpress.ru](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

Editor **L.K. Musatova**  
Proofreaders: **E.V. Maurina, R.V. Zhuravleva**  
Designer **E.V. Stepanova**  
Maker-up **E.A. Prokofieva**

## Subscription & Distribution Service

**I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,**  
[base@abvpress.ru](mailto:base@abvpress.ru)  
Project Manager  
**A.G. Prilepskaya, +7 (965) 319-10-53,**  
[alla@abvpress.ru](mailto:alla@abvpress.ru)

The journal was registered at the Federal Service for Surveillance of Communications, Information Technologies, and Mass Media (PII No. ФС77-36928 dated 21 July 2009).

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Onkogematologiya".

The editorial board is not responsible for advertising content.

The authors' point of view given in the articles may not coincide with the opinion of the editorial board.

ISSN 2413-4023 (Online)  
ISSN 1818-8346 (Print)  
Onkogematologiya. 2017.  
Volume 12. No 2. 1-96  
© PH "ABV-Press", 2017  
Pressa Rossii catalogue index: 42167

Printed at the Tverskoy Pechatny Dvor

3,000 copies

<http://oncohematology.abvpress.ru>

**EDITORIAL BOARD**

**Aleynikova Olga V.**, Associate Member of the National Academy of Science of the Republic of Belarus, Professor, Director of Republican Research and Medical Center for Oncology, Hematology and Immunology, Physician of the Highest Qualification Grade (Minsk, Republic of Belarus)

**Golenkov Anatoly K.**, MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Natural Sciences, Head of Department of Clinical Hematology and Immune Therapy in N.F. Vladimirsky Moscow Region Research Clinical Institute, Chief Hematologist of Moscow Region (Moscow, Russia)

**Dobrovinn Mikhail**, MD, PhD, Nuclear Medicine Division, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA)

**Karachunsky Alexander I.**, MD, PhD, Professor, Deputy General Director – Director of the Institute of Oncology, Radiology and Nuclear Medicine of National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia, Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Krivolapov Yuriy A.**, MD, PhD, Professor, Member of Pathologists Panel of European Lymphomas Research Group, Member of European Bone Marrow Research Group, Head of Anatomico-Pathological Department of Clinical Molecular Morphology of E.E. Eichwald Clinics, I.I. Mechnikov North-West State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)

**Mendeleeva Larisa P.**, MD, PhD, Deputy General Director for Science and Innovation – Director of the Research Institute of Hematology and Transplantation of Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Minkov M.L.**, MD, PhD, Vienna Hospital Association Rudolfstiftung Hospital, Clinic of Pediatrics and Adolescent Medicine with Department for Neonatology (Vienna, Austria)

**Myakova Natalya V.**, MD, PhD, Professor, Head of Oncohematology Department of National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Nikitin Evgeny A.**, MD, PhD, Head of the Day Hospital in Hematology Center of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department (Moscow, Russia)

**Parovichnikova Elena N.**, MD, PhD, Head of Department of Chemotherapy of Hematological Malignancy, Hematopoiesis Depression and Bone Marrow Transplantation in Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Ponomarev Vladimir B.**, MD, PhD, Department of Radiology of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, USA)

**Rukavitsyn Oleg A.**, MD, PhD, Professor, Head of Hematology Center of N.N. Burdenko General Military Clinical Hospital of Ministry of Defense of Russia, Chief Hematologist of the Hospital (Moscow, Russia)

**Uss Anatoly L.**, MD, PhD, Professor, Chief Hematologist of Ministry of Health of the Republic of Belarus, Member of Transplantology Committee of the Council of Europe and European Bone Marrow Transplantation Group, Head of Republican Center for Hematology and Bone Marrow Transplantation (Minsk, Republic of Belarus)

**Fechina Larisa G.**, Honored Doctor of the Russian Federation, Deputy Chief Physician for Oncology and Hematology of Regional Children's Clinical Hospital No. 1, Head of Center of Children's Oncology and Hematology (Yekaterinburg, Russia)

**EDITORIAL COUNCIL**

**Krijanovski Oleg I.**, MD, PhD, Director of Malignant Hematology Program "Alta Bates" Summit Medical Center (Berkeley, California, USA)

**Lukina Elena A.**, MD, PhD, Professor, Head of Clinical Research Department of Rare Diseases, Leading Researcher of the Department of Leukemia Chemotherapy and Erythron Pathology in Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Poddubnaya Irina V.**, MD, PhD, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Professor, Head of Oncology Department of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of Ministry of Health of Russia on the basis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Rossiev Viktor A.**, MD, PhD, Highest Grade Doctor, Head of Hematology Department in M.I. Kalinin Samara Regional Clinical Hospital (Samara, Russia)

**Rumyantsev Alexander G.**, MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Sciences, General Director of National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia, Chief Pediatric Hematologist of Ministry of Health of Russia, Board Member of the Union of Pediatricians of Russia (Moscow, Russia)

**Roumiantsev Sergey A.**, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of RAS, Vice-Rector for Strategic Development, Head of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; Head of Translational and Regenerative Medicine Department of Moscow Institute of Physics and Technology (State University) of Ministry of Education and Science of Russia (Moscow, Russia)

**Talalaev Alexander G.**, MD, PhD, Professor, Head of Pathology Department in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia based in Morozov Children's Municipal Clinical Hospital, Chief Children's Pathologist of Moscow (Moscow, Russia)

**ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ**

<i>Е.А. Барях</i> Лечение рецидивов и резистентных форм лимфомы Ходжкина .....	8
<i>Н.Н. Климко, С.Н. Хостелиди, О.В. Шадривова, Т.С. Богомолова, Ю.Л. Авдеенко, А.Г. Волкова, М.О. Попова, И.А. Михайлова, А.С. Колбин, Э.Г. Бойченко, Н.В. Медведева, Э.И. Подольцева, А.В. Климович, М.Б. Белогурова, И.С. Зюзгин, О.С. Успенская, В.Н. Семелев, Н.И. Пономарева, Г.К. Абдилова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев</i> Инвазивный мукомикоз у онкогематологических больных (результаты проспективного исследования) .....	14
<i>Л.Г. Горенкова, С.К. Кравченко, Е.Е. Клебанова, К.И. Данишян, М.А. Силаев, А.М. Ковригина, Н.В. Рыжикова, Н.И. Скидан, М.А. Цейтлина, В.Г. Савченко</i> Успешное применение брентуксимаба ведотина в терапии прогрессии периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной у пожилой пациентки .....	23
<i>А.А. Жернякова, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев, Л.Б. Полушкина, М.С. Фоминых, В.Ю. Удальева, И.И. Зотова, Д.И. Шихбабаева, С.В. Волошин, С.С. Бессмельцев, А.В. Четкин, К.М. Абдулкадыров</i> Факторы риска развития тромботических и геморрагических осложнений при эссенциальной тромбоцитемии .....	30

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ**

<i>Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов, Л.Н. Шелихова, А.Е. Руднева, М.А. Масчан, Г.В. Терещенко, Е.В. Скоробогатова, И.В. Кондратенко, С.С. Вахлярская, И.Д. Бородин, А.А. Бологов, А.Г. Румянцев, Е.В. Самочатова, А.А. Масчан</i> Вторичные солидные опухоли у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (клинические случаи и обзор литературы) .....	39
<i>Ю.В. Скворцова, Л.Н. Шелихова, Н.В. Мякова, Э.Р. Биячуев, Д.М. Коновалов, Д.С. Абрамов, М.А. Масчан, Е.В. Скоробогатов, А.Г. Румянцев, А.А. Масчан</i> Лимфоидные неоплазии после аллогенных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток. Случай развития вторичной лимфомы Ходжкина, дифференциальная диагностика с посттрансплантационным лимфопролиферативным заболеванием. ....	54
<i>И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева, Ю.О. Давыдова, М.В. Соловьев, Н.М. Капранов, Л.А. Кузьмина, Е.О. Грибанова, Т.В. Гапонова, В.Г. Савченко</i> Исследование минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитофлуориметрии у больных множественной миеломой после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток .....	62

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ**

<i>Р.С. Каландаров, Л.Л. Головкина, М. Н. Васильева, А.Г. Стремоухова, Т.Д. Пушкина, Г.В. Атрощенко, Е.Н. Паровичникова</i> Генотипирование групп крови систем АВ0 и резус у пациентов после множественных гемотрансфузий. ....	70
<i>И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, У.Л. Джулакян, Л.П. Менделеева</i> Роль и место проточной цитометрии в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при множественной миеломе. ....	80

**HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE**

- E.A. Baryakh*  
**Treatment of relapse and refractory Hodgkin lymphoma** . . . . . 8
- N.N. Klimko, S.N. Khostelidi, O.V. Shadrivova, T.S. Bogomolova, Y.L. Avdeenko, A.G. Volkova, M.O. Popova, I.A. Mihailova, A.S. Kolbin, E.G. Boychenko, N.V. Medvedeva, E.I. Podoltseva, A.V. Klimovich, M.B. Belogurova, I.S. Zuzgin, O.S. Uspenskaya, V.N. Semelev, N.I. Ponomoreva, G.K. Abdilova, L.S. Zuborovskaya, B.V. Afanasiev*  
**Mucormycosis in oncohematology patients (results of the prospective study)** . . . . . 14
- L.G. Gorenkova, S.K. Kravchenko, E.E. Klebanova, K.I. Danishyan, M.A. Silaev, A.M. Kovrigina, N.V. Rizikova, N.I. Skidan, M.A. Ceitlina, V.G. Savchenko*  
**Successful use of brentuximab vedotin in the treatment of progressive peripheral unspecified T-cell lymphoma in an elderly female patient** . . . . . 23
- A. Zhernyakova, I. Martynkevich, V. Shuvaev, L. Polushkina, M. Fominykh, V. Udal'eva, I. Zotova, D. Shichbabaeva, S. Voloshin, S. Bessmeltcev, A. Chechetkin, K. Abdulkadyrov*  
**Thrombotic and bleeding risk factors in essential thrombocythemia** . . . . . 30

**HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH HEMOBLASTOSIS**

- Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov, L.N. Shelichova, A.E. Rudneva, M.A. Maschan, G.V. Tereshchenko, E.V. Skorobogatova, I.V. Kondratenko, S.S. Vachlyarskaya, I.D. Borodina, A.A. Bologov, A.G. Rummyantsev, E.V. Samochatova, A.A. Maschan*  
**Secondary solid tumors in children after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation: case reports and literature review** . . . . . 39
- Yu.V. Skvortsova, L.N. Shelichova, N.V. Myakova, E.R. Biyachuev, D.M. Konovalov, D.S. Abramov, M.A. Maschan, E.V. Skorobogatova, A.G. Rummyantsev, A.A. Maschan*  
**Lymphoid neoplasms after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. The case of secondary Hodgkin's lymphoma, differential diagnosis with post-transplant lymphoproliferative disease** . . . . . 54
- I.V. Galtseva, L.P. Mendeleeva, Y.O. Davydova, M.V. Solov'ev, N.M. Kapranov, L.A. Kuzmina, E.O. Gribanova, T.V. Gaponova, V.G. Savchenko*  
**Study of minimal residual disease by multicolor flow cytometry in multiple myeloma after autologous hematopoietic stem cell transplantation** . . . . . 62

**FUNDAMENTAL RESEARCH IN PRACTICAL MEDICINE AT THE PRESENT STAGE**

- R.S. Kalandarov, L.L. Golovkina, M.N. Vasilieva, A.G. Stremouchova, T.D. Pushkina, G.V. Atroshchenko, E.N. Parovichnikova*  
**Genotyping of ABO and Ph systems blood groups in patients after multiple hemotransfusions** . . . . . 70
- I.V. Galtseva, Y.O. Davydova, N.M. Kapranov, U.L. Dzhulakyan, L.P. Mendeleeva*  
**Flow cytometry in the diagnosis and monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma** . . . . . 80

## Лечение рецидивов и резистентных форм лимфомы Ходжкина

Е.А. Барях<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения города Москвы; Россия, 123182 Москва, ул. Пехотная, 3;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

**Контакты:** Елена Александровна Барях ebaryakh@gmail.com

Благодаря стремительным успехам в развитии онкогематологии за полвека лимфома Ходжкина (ЛХ) превратилась из фатального в наиболее курабельное лимфопролиферативное заболевание. Несмотря на достигнутые успехи, 5–10 % больных ЛХ первично рефрактерны и 10–30 % рецидивируют после инициальной терапии. Проведение терапии 2-й линии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток является стандартом лечения и позволяет достичь длительных ремиссий у 50 % больных. Появление брентуксимаба ведотина, представляющего конъюгат цитостатика и антитела к CD30, кардинально изменило возможности терапии рецидивов и резистентных форм ЛХ и значительно улучшило прогноз заболевания. В статье представлен обзор литературы, посвященный лечению рецидивов и резистентных форм лимфомы Ходжкина.

**Ключевые слова:** лимфома Ходжкина, рецидив, рефрактерность, CD30, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, брентуксимаб ведотин

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-8-13

### Treatment of relapse and refractory Hodgkin lymphoma

E.A. Baryakh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clinical State Hospital No. 52; 3, Pechotnaya str., Moscow 123182, Russia;

<sup>2</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Hodgkin lymphoma (HL) represents one of the great success stories in hematology going from a uniformly fatal disease, to one that is curable in the vast majority of cases. Despite this success, approximately 5–10 % HL patients are refractory to initial treatment and 10–30 % of patients will relapse after achieving an initial complete remission. The standard treatment is second-line therapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (autoHSCT), which cures an additional 50 % of patients. Brentuximab Vedotin, “antibody-drug conjugate”, dramatically changed the possibilities of therapy for relapses/refractory HL. The article presents a review of the literature on the treatment of relapses/refractory HL.

**Key words:** Hodgkin lymphoma, relapse, refractory disease, CD30, autologous hematopoietic cell transplantation, brentuximab vedotin

#### Введение

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в терапии лимфомы Ходжкина (ЛХ), рецидивы возникают у 10–15 % больных с локальными и у 20–40 % с генерализованными стадиями заболевания (в зависимости от факторов неблагоприятного прогноза и проводимого лечения) [1]. В 40–50 % случаев рецидивы регистрируются в течение 12 мес после завершения инициальной полихимиотерапии [2, 3].

Проведение терапии 2-й линии позволяет достичь ремиссии только у половины больных [4]. Различные программы полихимиотерапии (ПХТ) 2-й линии у больных ЛХ, представленные в табл. 1, дают возможность сравнить их по эффективности.

Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) является стандартом консолидирующей терапии во 2-й ремиссии у пациентов с рецидивами ЛХ [15–28] и больных с первично-резистентным течением и рефрактерностью к индукционной терапии при достижении ремиссии на терапии 2-й линии [15–30]. Беспрогрессивная и общая выживаемость (БПВ и ОВ) у пациентов с рецидивами ЛХ составляет соответственно 50–60 и 50–80 % [15–28]. У больных с рефрактерным течением ЛХ БПВ варьирует от 40 до 45 %, ОВ – от 30 до 70 % [15–30].

До недавнего времени у пациентов с первично-рефрактерным течением или рецидивом заболевания после аутоТГСК основной опцией являлась паллиативная терапия.

Таблица 1. Эффективность различных программ полихимиотерапии (ПХТ) 2-й линии у больных с лимфомой Ходжкина

Table 1. The efficacy of various second-line polychemotherapy (PCT) programs in patients with Hodgkin lymphoma

Схемы ПХТ PCT schemes	Число пациентов, n Number of patients, n	Общая частота ответа, % Overall response rate, %	Полная ремиссия, % Complete remission, %	Источник References
Деха-BEAM	144	81	27	[5]
Mini-BEAM	55	84	51	[6]
ICE	65	88	26	[7]
IGEV	91	81	54	[8]
GVD	91	70	19	[9]
GDP	23	70	17	[10]
EPOCH	14	86	7	[11]
ESHAP	22	73	41	[12]
DHAP	102	89	21	[13]
MINE	97	75	34	[14]

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: Деха-BEAM – дексаметазон, кармустин, этопозид, цитарабин, мелфалан; DHAP – дексаметазон, цитарабин, цисплатин; EPOCH – этопозид, преднизолон, винкристин, циклофосфамид, доксорубицин; ESHAP – этопозид, солумедрол, цитарабин, цисплатин; GDP – гемцитабин, дексаметазон, цисплатин; GVD – гемцитабин, винорелбин, липосомальный доксорубицин; ICE – ифосфамид, карбоплатин, этопозид; IGEV – ифосфамид, гемцитабин, этопозид, винорелбин; MINE – митогуазон, ифосфамид, винорелбин, этопозид; Mini-BEAM – кармустин, этопозид, цитарабин, мелфалан.

**Note.** Here and in table 2: Dexa-BEAM – Dexamethasone, Carmustine (BCNU), Etoposide, Cytarabine (Ara-C), Melphalan; DHAP – Dexamethasone, High dose cytarabine (Ara-C), Cisplatin; EPOCH – Etoposide, Prednisolone, Oncovin (vincristine), Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin (doxorubicin); ESHAP – Etoposide, Solumedrol (methylprednisolone), High dose cytarabine (Ara-C), Cisplatin; GDP – Gemcitabine, Dexamethasone, Cisplatin; GVD – Gemcitabine, Vinorelbine, liposomal Doxorubicin; ICE – Ifosfamide, Carboplatin, Etoposide; IGEV – Ifosfamide, Gemcitabine, Etoposide, Vinorelbine; MINE – Mitoguzone, Ifosfamide, Vinorelbine (Navelbine), Etoposide; Mini-BEAM – Carmustine (BCNU), Etoposide, Cytarabine (Ara-C), Melphalan.

### Антиген CD30 и брентуксимаб ведотин

Антиген CD30 (TNFRSF80) является трансмембранным рецептором 1-го типа, который относится к суперсемейству рецепторов к фактору некроза опухоли.

Эффективность химерного антитела AT SGN-30 продемонстрирована на клеточных линиях ЛХ и анапластической крупноклеточной лимфомы. Эффект реализовывался путем активации сигнального пути NF-κB (транскрипционного нуклеарного фактора, регулирующего экспрессию различных генов, ответственных за апоптоз, воспаление и туморогенез), что приводило к нарушению роста и апоптозу опухолевой клетки [31].

Цитостатический препарат монометилауристин Е (ММАЕ) получен в начале 2000 г. из оболочки морского моллюска *Dolabella auricularia*. Антимитотическое действие препарата было обусловлено ингибированием полимеризации тубулина, блокированием клеточного цикла в G2/M-фазе и инициацией апоптоза опухолевой клетки. Противоопухолевая эффективность ММАЕ оказалась в 200 раз выше, чем у винбластин. В то же время крайне высокая токсичность цитостатика являлась препятствием для его клинического применения в неизменном виде [32].

Стало очевидной необходимость создания препарата, обеспечивающего доставку ММАЕ внутрь опухолевой клетки без системного токсического воздействия.

Синтезированный конъюгат моноклонального антитела к CD30 и цитостатика получил название брентуксимаба ведотина (БВ). Его появление кардинально изменило возможности терапии рецидивов и резистентных форм ЛХ и значительно улучшило прогноз заболевания.

БВ включает в себя 3 компонента: антитело (специфичное для антигена CD30 и представленное рекомбинантным химерным IgG1), ММАЕ и связующий линкер (рис. 1). Помимо основного действия, заключающегося в доставке цитотоксического агента к клетке-мишени, БВ вызывает опосредованные (вторичные) эффекты, приводящие к гибели опухолевой клетки – иммуноопосредованную гибель клетки, антителозависимую клеточную цитотоксичность и эффект «свидетеля» (рис. 2) [33–35].

Индукцируемый цитостатическими агентами апоптоз (так называемая иммуногенная клеточная гибель) отличается от апоптоза классического. Иммуногенная гибель клетки вызывает ряд сигналов, активирующих иммунную систему с целью распо-

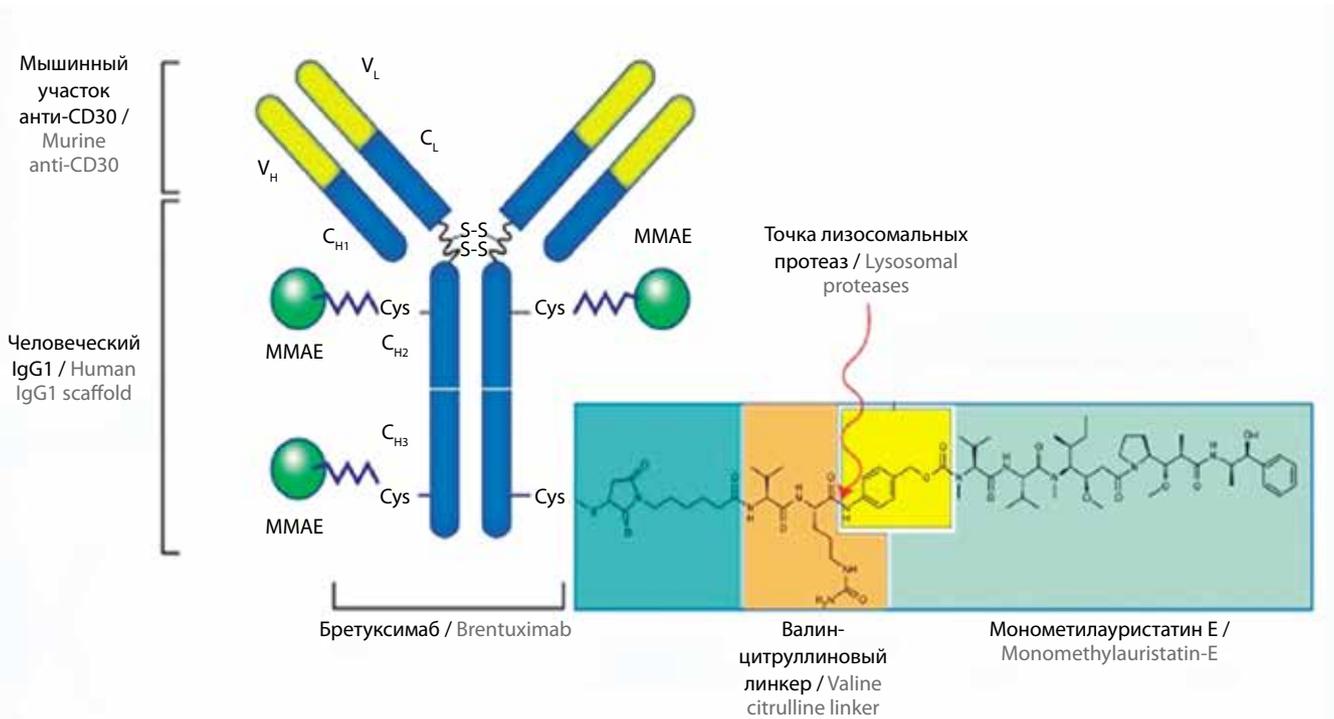


Рис. 1. Характеристика препарата брентуксимаба ведотина (адаптировано из [31]).

$C_{H1}$  – константные области тяжелой цепи иммуноглобулина,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$  – домены  $CH_2$  и  $CH_3$ ,  $C_L$  – константные области легкой цепи иммуноглобулина, Cys – цистеин,  $IgG_1$  – иммуноглобулин класса G1, MMAE – монометилауристатин E,  $V_H$  – переменные области тяжелой цепи иммуноглобулина,  $V_L$  – переменные области легкой цепи иммуноглобулина

Fig. 1. Characteristics of Brentuximab Vedotin (adapted from [31]).

$C_{H1}$  – constant region of the immunoglobulin heavy chain,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$  – domain  $CH_2$  and  $CH_3$ ,  $C_L$  – constant region of the immunoglobulin light chain, Cys – cysteine,  $IgG_1$  – immunoglobulin G1, MMAE – monomethylauristatin-E,  $V_H$  – variable region of the immunoglobulin heavy chain,  $V_L$  – variable region of the immunoglobulin light chain

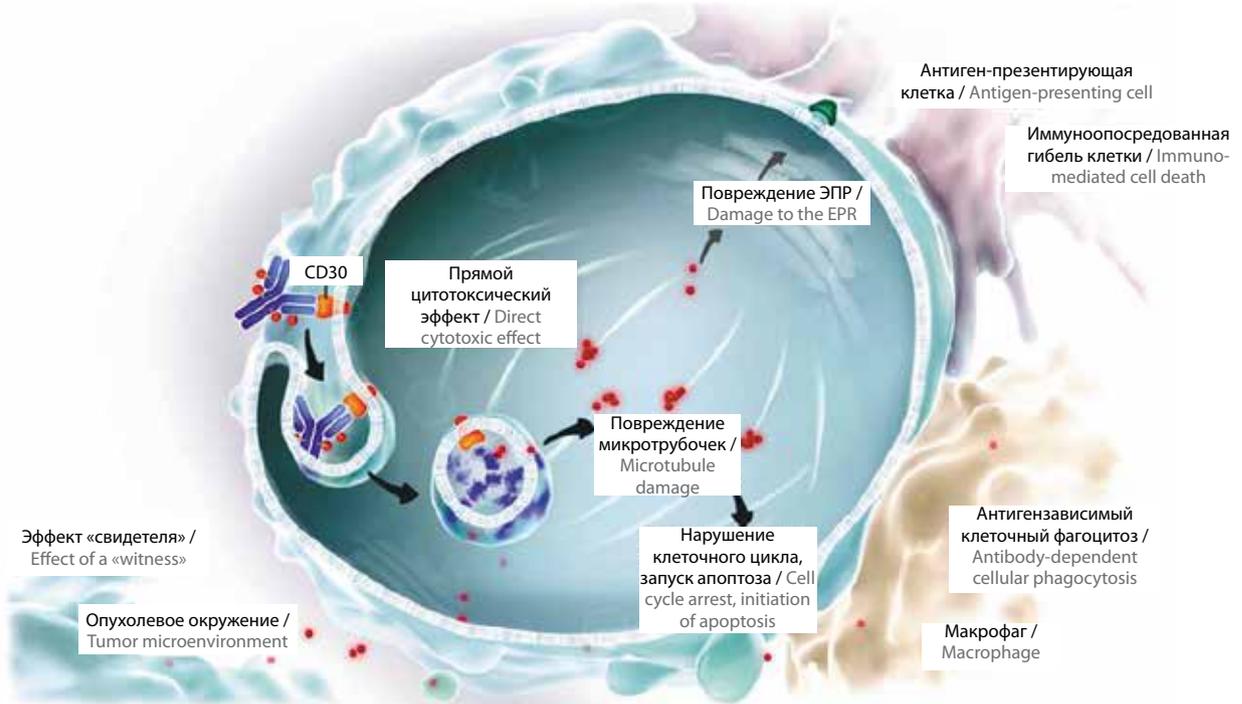


Рис. 2. Прямые и опосредованные эффекты брентуксимаба ведотина (рисунок размещен с согласия компании Takeda).

CD30 – антиген CD30, ЭПР – эндоплазматический ретикулум

Fig. 2. Direct and indirect effects of Brentuximab Vedotin (image courtesy of Takeda company).

CD30 – antigen CD30, EPR – endoplasmic reticulum

знания опухолевых клеток и их уничтожения: ММАЕ индуцирует стресс эндоплазматического ретикулума и выработку активных форм кислорода, а также выделение поврежденных молекулярных структур на поверхности клеток, что способствует активации дендритных и других антиген-представляющих клеток и разрушению клеток, к которым был индуцирован «стресс» эндоплазматического ретикулума [35, 36].

Антителозависимая клеточная цитотоксичность реализуется посредством стимуляции фрагментов Fc-рецептора на поверхности макрофагов, В-, НК- и фолликулярных дендритических клеток в ответ на введение БВ. Активация фагоцитоза и клеточной цитотоксичности приводит к гибели опухолевых клеток [34].

Эффект «свидетеля», или эффект летального соседства, обусловлен воздействием фракции свободного ММАЕ, диффундирующего из погибших опухолевых клеток, на клетки микроокружения [36].

#### **Терапия брентуксимабом ведотином у пациентов с лимфомой Ходжкина после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток**

Целью рандомизированного, двойного слепого, плацебоконтролируемого международного исследования AETHERA стало определение эффективности БВ у пациентов с рецидивами или рефрактерным течением лимфомы Ходжкина с высоким риском прогрессии после проведенной аутоТГСК. В AETHERA было включено 329 пациентов: 156 больных в группу БВ и 164 в группу плацебо. Основными критериями включения являлись рефрактерность к 1-й линии

терапии, длительность ремиссии менее 12 мес или наличие экстранодального поражения на момент развития рецидива. БВ назначали в стандартной дозе (1,8 мг/кг) внутривенно с интервалом в 21 день. Первичной конечной точкой являлась БПВ, вторичными конечными точками – ОВ и безопасность, исключающая нежелательные явления, лабораторные отклонения и иммуногенность. Расчетная 2-летняя БПВ составила 63 % для группы БВ и 51 % для группы плацебо, медиана БПВ составила 42,9 и 24,1 мес соответственно. Исследование AETHERA продемонстрировало, что применение БВ снижает риск прогрессии на 43 % при медиане наблюдения 30 мес. Наиболее частым нежелательным явлением была периферическая нейропатия. Однако ее тяжелые проявления (не менее III степени) регистрировались в 10 % случаев. Таким образом, исследование AETHERA продемонстрировало эффективность БВ в качестве консолидирующей терапии после аутоТГСК у пациентов с рецидивами и рефрактерным течением ЛХ, а также благоприятный профиль безопасности и переносимости БВ [37].

#### **Брентуксимаб ведотин в терапии второй и третьей линии терапии при лимфоме Ходжкина**

Наглядно продемонстрированная эффективность БВ у пациентов с высоким риском прогрессии после проведенной аутоТГСК подтолкнула к дальнейшим исследованиям сочетаний комбинаций ПХТ 2-й и 3-й линий и БВ. В табл. 2 представлены результаты лечения больных ЛХ по программам ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид), ESHAP (этопозид, солумедрол, цитарабин, цисплатин) и монотерапии бенда-

**Таблица 2.** Эффективность сочетания брентуксимаба ведотина с режимами полихимиотерапии (ПХТ) 2-й линии для индукции ремиссии перед ВХТ с трансплантацией аутологичных стволовых клеток крови

**Table 2.** The efficacy of Brentuximab Vedotin in combination with second-line polychemotherapy (PCT) for the remission induction before autologous stem cell of blood transplantation

Схемы ПХТ PCT schemes	Число пациентов, n Number of patients, n	Полная ремиссия Complete remission	Источник References
ICE ICE	65	26	[7]
БВ + ICE BV + ICE	46	73	[38]
Бендамустин Bendamustine	34	33	[39]
БВ + бендамустин BV + Bendamustine	53	76	[40]
ESHAP ESHAP	22	41	[12]
БВ + ESHAP BV + ESHAP	36	83	[41]

**Примечание.** БВ – брентуксимаб ведотин.

**Note.** BV – brentuximab vedotin.

мустином, а также при аугментации вышеуказанных схем БВ.

Включение БВ в классические протоколы лечения 2-й и 3-й линий («терапии спасения») позволяет более чем в 2 раза увеличить количество достигнутых полных ремиссий, делая возможным выполнение консолидирующей аутоТГСК. Применение вышеуказанных схем для достижения ремиссий при рецидивах после аутоТГСК служит «мостиком» для выполнения аллоТГСК.

#### Повторное применение брентуксимаба ведотина

Во II фазе многоцентрового открытого исследования SG035–006 оценивали применение БВ у пациентов с рецидивирующей и рефрактерной ЛХ, ранее принимавших участие в протоколах с БВ. В исследовании включен 21 пациент: 5 (24 %) больных с рефрактерным течением заболевания и 16 (76 %) с рецидивом. Медиана времени между последним введением на этапе предшествующей терапии и настоящим применением препарата была 11,4 мес. Общая частота ответа (полные и частичные ремиссии) составила 60 % (12 больных), у половины больных достигнута полная ремиссия. Медиана БПВ составила 9,9 мес. Достигшим

ремиссии пациентам (2 из 6) выполнена аллоТГСК. Профиль побочных эффектов был прогнозируемым, управляемым и практически не отличался от профиля при первичном назначении БВ. Таким образом, повторное применение БВ не менее эффективно, чем его использование на предшествующем этапе, а развивающиеся побочные эффекты контролируемы и не препятствуют дальнейшей терапии [42].

#### Выводы

Терапия рецидивов и рефрактерных форм ЛХ является крайне актуальной проблемой. Появление брентуксимаба ведотина определило целый спектр новых возможностей в терапии ЛХ: применение у больных с высоким риском рецидива после аутоТГСК, использование в сочетании с программами «терапии спасения» для достижения ремиссий перед аутоТГСК или в качестве «мостика» для выполнения аллоТГСК. Высокая эффективность и приемлемая токсичность брентуксимаба ведотина в лечении рецидивов и рефрактерных форм ЛХ определили направления дальнейших исследований – включение препарата в терапию 1-й линии как в группе благоприятного, так и неблагоприятного прогноза ЛХ.

#### Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Josting A., Franklin J., May M. et al. New prognostic score based on treatment outcome of patients with relapsed Hodgkin's lymphoma registered in the database of the German Hodgkin's lymphoma study group. *J Clin Oncol* 2002;20(1):221–30. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.1.221.
- Bonfante V., Santoro A., Viviani S. et al. Outcome of patients with Hodgkin's disease failing after primary MOPP-ABVD. *J Clin Oncol* 1997;15(2):528–34. DOI: 10.1200/JCO.1997.15.2.528.
- Radman I., Basić N., Labar B. et al. Long-term results of conventional-dose salvage chemotherapy in patients with refractory and relapsed Hodgkin's disease (Croatian experience). *Ann Oncol* 2002;13(10):1650–5. PMID: 12377656.
- Ramchandren R. Advances in the Treatment of Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *Oncologist* 2012;17(3):367–76. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0258.
- Schmitz N., Pfistner B., Sextro M. et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: A randomised trial. *Lancet* 2002;359:2065–71. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)08938-9.
- Martin A., Fernández-Jiménez M.C., Caballero M.D. et al. Long-term follow-up in patients treated with mini-BEAM as salvage therapy for relapsed or refractory Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 2001;113:161–71. PMID: 11328296.
- Moskowitz C.H., Nimer S.D., Zelenetz A.D. et al. A 2-step comprehensive high-dose chemoradiotherapy second-line program for relapsed and refractory Hodgkin disease: Analysis by intent to treat and development of a prognostic model. *Blood* 2001;97:616–23. PMID: 11157476.
- Engert A., Diehl V., Franklin J. et al. Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J Clin Oncol* 2009;27:4548–54. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.8820.
- Bartlett N.L., Niedzwiecki D., Johnson J.L. et al. Gemcitabine, vinorelbine, and pegylated liposomal doxorubicin (GVD), a salvage regimen in relapsed Hodgkin's lymphoma: CALGB 59804. *Ann Oncol* 2007;18:1071–9. DOI: 10.1093/annonc/mdm090.
- Baetz T., Belch A., Couban S. et al. Gemcitabine, dexamethasone and cisplatin is an active and non-toxic chemotherapy regimen in relapsed or refractory Hodgkin's disease: A phase II study by the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 2003;14:1762–1767. PMID: 14630682
- Stokoe C.T., Ogden J., Jain V.K. Activity of infusional etoposide, vincristine, and doxorubicin with bolus cyclophosphamide (EPOCH) in relapsed Hodgkin's disease. *The Oncologist* 2001;6:428–34. PMID: 11675520.
- Aparicio J., Segura A., Garcerà S. et al. ESHAP is an active regimen for relapsing Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1999;10:593–5. PMID: 10416011.
- Josting A., Rudolph C., Reiser M. et al. Time-intensified dexamethasone/cisplatin/cytarabine: An effective salvage therapy with low toxicity in patients with relapsed and refractory Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002;13:1628–35. PMID: 12377653.

14. Ferme C., Bastion Y., Lepage E. et al. The MINE regimen as intensive salvage chemotherapy for relapsed and refractory Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1995;6:543–9. PMID: 8573532.
15. Vigouroux S., Milpied N., Andrieu J.M. et al. Front-line high-dose therapy with autologous stem cell transplantation for high risk Hodgkin's disease: comparison with combined-modality therapy. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:833–42. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703547.
16. Ferme C., Mounier N., Divine M. et al. Intensive salvage therapy with high-dose chemotherapy for patients with advanced Hodgkin's disease in relapse or failure after initial chemotherapy: results of the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte H89 Trial. *J Clin Oncol* 2002;20:467–75. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.2.467.
17. Stiff P.J., Unger J.M., Forman S.J. et al. The value of augmented preparative regimens combined with an autologous bone marrow transplant for the management of relapsed or refractory Hodgkin disease: a Southwest Oncology Group phase II trial. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:529–39. PMID: 12931122.
18. Tarella C., Cuttica A., Vitolo U. et al. High-dose sequential chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting in patients with refractory and/or recurrent Hodgkin lymphoma: a multicenter study of the intergruppo Italiano Linfomi showing prolonged disease free survival in patients treated at first recurrence. *Cancer* 2003;97:2748–59. DOI: 10.1002/cncr.11414.
19. Popat U., Hosing C., Saliba R.M. et al. Prognostic factors for disease progression after high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for recurrent or refractory Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:1015–23. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704483.
20. Lavoie J.C., Connors J.M., Phillips G.L. et al. High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for primary refractory or relapsed Hodgkin lymphoma: long-term outcome in the first 100 patients treated in Vancouver. *Blood* 2005;106:1473–8. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4689.
21. Morabito F., Stelitano C., Luminari S. et al. The role of high-dose therapy and autologous stem cell transplantation in patients with primary refractory Hodgkin's lymphoma: a report from the Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi (GISL). *Bone Marrow Transplant*, 2006;37:283–8. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705235.
22. Czyz J., Dziadziszko R., Knopinska-Posuszuy W. et al. Outcome and prognostic factors in advanced Hodgkin's disease treated with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: a study of 341 patients. *Ann Oncol* 2004;15:1222–30. DOI: 10.1093/annonc/mdh304.
23. Schellong G., Dorffel W., Claviez A. et al. Salvage therapy of progressive and recurrent Hodgkin's disease: results from a multicenter study of the pediatric DAL/GPOH-HD study group. *J Clin Oncol* 2005;23:6181–9. DOI: 10.1200/JCO.2005.07.930.
24. Sieniawski M., Franklin J., Nogova L. et al. Outcome of patients experiencing progression or relapse after primary treatment with two cycles of chemotherapy and radiotherapy for early-stage favorable Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:2000–5. DOI: 10.1200/JCO.2006.10.1386.
25. Viviani S., Di Nicola M., Bonfante V. et al. Long-term results of high-dose chemotherapy with autologous bone marrow or peripheral stem cell transplant as first salvage treatment for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: a single institution experience. *Leuk Lymph* 2010;51:1251–9. DOI: 10.3109/10428194.2010.486090.
26. Garfin P.M., Link M.P., Donaldson S.S. et al. Improved outcomes after autologous bone marrow transplantation for children with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: twenty years experience at a single institution. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:326–34. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.10.020.
27. Nieto Y., Popat U., Anderlini P. et al. Autologous stem cell transplantation for refractory or poor-risk relapsed Hodgkin's lymphoma: effect of the specific high-dose chemotherapy regimen on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:410–7. DOI: 10.1016/j.bbmt.2012.10.029.
28. McCarthy P.L. Jr., Hahn T., Hassebroek A. et al. Trends in use of and survival after autologous hematopoietic cell transplantation in North America, 1995-2005: significant improvement in survival for lymphoma and myeloma during a period of increasing recipient age. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1116–23. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.04.027.
29. Puig N., Pintilie M., Seshadri T. et al. Different response to salvage chemotherapy but similar post-transplant outcomes in patients with relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2010;95:1496–502. DOI: 10.3324/haematol.2009.019943.
30. Viviani S., Zinzani P.L., Rambaldi A. et al. ABVD versus BEACOPP for Hodgkin's lymphoma when high-dose salvage is planned. *N Engl J Med* 2011;365:203–12. DOI: 10.1056/NEJMoa1100340.
31. Váklavas C., Forero-Torres A. Safety and efficacy of brentuximab vedotin in patients with Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Ther Adv Hematol* 2012;3(4):209–25. DOI: 10.1177/2040620712443076.
32. Francisco J.A., Cerveny C.G., Meyer D.L., Mixan B.J., Klussman K., Chace D.F. et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 2003;102(4):1458–65. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0039.
33. Sutherland M.S., Sanderson R.J., Gordon K.A. et al. Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. *J Biol Chem* 2006;281:10540–7. DOI: 10.1074/jbc.M510026200.
34. Oflazoglu E., Stone I.J., Gordon K.A., Grewal I.S., van Rooijen N., Law C.L., Gerber H.P. Macrophages contribute to the antitumor activity of the anti-CD30 antibody SGN-30. *Blood* 2007;110(13):4370–2. DOI: 10.1182/blood-2007-06-097014.
35. Müller P., Martin K., Theurich S. et al. Microtubule-depolymerizing agents used in antibody-drug conjugates induce antitumor immunity by stimulation of dendritic cells. *Cancer Immunol Res* 2014;2(8):741–55. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0198.
36. Garda S.J., Angela Epp A., Law C.L. Brentuximab vedotin-mediated immunogenic cell death. *AACR 106th Annual Meeting* 2015;April 18–22, 2015;Philaed, Abstract 2469.
37. Moskowitz C.H., Nademanee A., Masszi T. et al. Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2015;385(9980):1853–62. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60165-9.
38. Moskowitz A.J., Schöder H., Yahalom J. et al. PET-adapted sequential salvage therapy with brentuximab vedotin followed by augmented ifosfamide, carboplatin, and etoposide for patients with relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma: a non-randomised, open-label, single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015;16(3):284–92. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70013-6.
39. Moskowitz A.J., Hamlin P.A., Perales M-A. et al. Phase II Study of Bendamustine in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* 2013;31(4):456–60. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.3308.
40. LaCasce A.S., Bociek G., Sawas A. et al. Brentuximab Vedotin Plus Bendamustine: A Highly Active Salvage Treatment Regimen for Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma. *Blood*, 2015;126(23):3982.
41. Garcia-Sanz R., Sureda A., Alonso-Alvarez S. et al. Evaluation of the Regimen Brentuximab Vedotin Plus ESHAP (BRESHAP) in Refractory or Relapsed Hodgkin Lymphoma Patients: Preliminary Results of a Phase I-II Trial from the Spanish Group of Lymphoma and Bone Marrow Transplantation (GELTAMO). *Blood* 2015;126(23):582.
42. Bartlett N.L., Chen R., Fanale M.A. et al. Retreatment with brentuximab vedotin in patients with CD30-positive hematologic malignancies. *J Hematol Oncol* 2014;7:24. DOI: 10.1186/1756-8722-7-24

## Инвазивный мукомикоз у онкогематологических больных (результаты проспективного исследования)

Н.Н. Климко<sup>1</sup>, С.Н. Хостелиди<sup>1</sup>, О.В. Шадринова<sup>1</sup>, Т.С. Богомолова<sup>1</sup>, Ю.Л. Авдеенко<sup>1</sup>, А.Г. Волкова<sup>2</sup>, М.О. Попова<sup>2</sup>, И.А. Михайлова<sup>2</sup>, А.С. Колбин<sup>3</sup>, Э.Г. Бойченко<sup>3</sup>, Н.В. Медведева<sup>4</sup>, Э.И. Подольцева<sup>4</sup>, А.В. Климович<sup>4</sup>, М.Б. Белогурова<sup>4</sup>, И.С. Зюзгин<sup>5</sup>, О.С. Успенская<sup>6</sup>, В.Н. Семелев<sup>7</sup>, Н.И. Пономарева<sup>8</sup>, Г.К. Абдилова<sup>9</sup>, Л.С. Зубаровская<sup>2</sup>, Б.В. Афанасьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России; Россия, 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8;

<sup>3</sup>Санкт-Петербургское ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31»; Россия, 197110 Санкт-Петербург, просп. Динамо, 3;

<sup>4</sup>Санкт-Петербургское ГБУЗ «Детская городская больница № 1»; Россия, 198205 Санкт-Петербург, ул. Авангардная, 14, лит. А;

<sup>5</sup>ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;

Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

<sup>6</sup>ГБУЗ Ленинградской области «Ленинградская областная клиническая больница»;

Россия, 194291 Санкт-Петербург, пр. Луначарского, 45–49;

<sup>7</sup>ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;

Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6;

<sup>8</sup>ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России; Россия, 119571 Москва, Ленинский просп., 117;

<sup>9</sup>Республиканское государственное казенное предприятие «Научный центр педиатрии и детской хирургии» Минздрава

Республики Казахстан; Республика Казахстан, 050040 Алматы, ул. Аль-Фараби, 146

**Контакты:** Николай Николаевич Климко n\_klimko@mail.ru

С 2004 по 2016 г. были проспективно обследованы 59 онкогематологических пациентов с мукомикозом (21 ребенок, 38 взрослых). Наиболее частыми фоновыми заболеваниями были острые лейкозы (64 %), основными факторами риска — длительные (медиана — 30 дней) агранулоцитоз и лимфоцитопения после интенсивной цитостатической и (или) кортикостероидной терапии, а также после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Возбудителями мукомикоза являлись *Rhizopus spp.* (47 %), *Rhizomucor spp.* (28 %), *Lichtheimia corymbifera* (17 %) и *Mucor spp.* (8 %). У детей чаще выделяли *Lichtheimia corymbifera*, у взрослых — *Rhizopus* и *Mucor spp.* Мукомикоз начинался с поражения легких (73 %) и придаточных пазух носа (15 %), дальнейшее вовлечение других органов и систем выявили у 44 % пациентов. Противогрибковые препараты (позаконазол, липидный комплекс амфотерицина В, каспофунгин, амфотерицин В) получали 78 % больных, хирургическое лечение — 47 %. Общая выживаемость больных в течение 3 мес составила 59 %. Негативными прогностическими факторами являлись: длительно текущий агранулоцитоз, продолжительное применение глюкокортикостероидов, поражение не менее 2 органов, кровохарканье и двустороннее поражение легких с гидротораксом. Позитивными прогностическими факторами была ремиссия фонового заболевания, а также применение комбинированной антимикотической терапии.

**Ключевые слова:** мукомикоз, острый лейкоз, позаконазол, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor*

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-14-22

### Mucormycosis in oncohematology patients (results of the prospective study)

N.N. Klimko<sup>1</sup>, S.N. Khostelidi<sup>1</sup>, O.V. Shadrivova<sup>1</sup>, T.S. Bogomolova<sup>1</sup>, Y.L. Avdeenko<sup>1</sup>, A.G. Volkova<sup>2</sup>, M.O. Popova<sup>2</sup>, I.A. Mihailova<sup>2</sup>, A.S. Kolbin<sup>3</sup>, E.G. Boychenko<sup>3</sup>, N.V. Medvedeva<sup>4</sup>, E.I. Podoltseva<sup>4</sup>, A.V. Klimovich<sup>4</sup>, M.B. Belogurova<sup>4</sup>, I.S. Zuzgin<sup>5</sup>, O.S. Uspenskaya<sup>6</sup>, V.N. Semelev<sup>7</sup>, N.I. Ponomareva<sup>8</sup>, G.K. Abdilova<sup>9</sup>, L.S. Zubarovskaya<sup>2</sup>, B.V. Afanasiev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Ministry of Health of Russia; 41 Kirochnaya St., Saint Petersburg, 191015, Russia;

<sup>2</sup>I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia;

<sup>3</sup>Children City Hospital No 1; 14 Avangardnaya St., Saint Petersburg, 198205, Russia

<sup>4</sup>City Clinical Hospital No 31; 3 Dinamo St., St. Petersburg, 197110, Russia;

<sup>5</sup>N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia;

68, Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

<sup>6</sup>Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg; 45–49 Lunacharskogo Prosp., St. Petersburg, 194291, Russia;

<sup>7</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defence of Russia; 6 Akademika Lebedeva St., Saint Petersburg 194044, Russia;

<sup>8</sup>Russian Children Clinical Hospital, Ministry of Health of Russia; 117 Leninskiy Prospect, Moscow, 119571, Russia;

<sup>9</sup>Republican State Fiscal Organization Scientific Center of Pediatrics and Pediatric Surgery; 146, Al'-Farbi str., Almaty, Kazakhstan, 050040

*In 2004–2016 we prospectively observed 59 oncohematology patients with mucormycosis, 21 children and 38 adults. The most frequent underlying diseases were acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia (64 %), and main risk factors were cytostatic chemotherapy and allogeneic HSCT with prolonged (median – 30 days) neutropenia and lymphocytopenia. The etiology agents were Rhizopus spp. (47 %), Rhizomucor spp. (28 %), Lichtheimia corymbifera (17 %) and Mucor spp. (8 %). Lichtheimia corymbifera was found more often in children, Rhizopus and Mucor spp. in adults. Pulmonary mucormycosis was main clinical form (73 %), and  $\geq 2$  organs involvement was noted in 44 % patients. Antifungal therapy was used in 78 % patients, surgery – in 47 %. In treated with antifungals patients 12 weeks overall survival was 59 %. The positive prognostic factors were remission of underlying disease and combination antifungal therapy.*

**Key words:** acute leukemia, mucormycosis, Lichtheimia corymbifera, Mucor, posaconazole, Rhizopus, Rhizomucor.

## Введение

Инвазивные микозы – распространенные осложнения у онкогематологических больных. Это связано не только с совершенствованием методов диагностики микозов, но и с более «агрессивными» схемами цитостатической терапии, широким использованием трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и органов как «терапии спасения» [1]. Кроме того, инвазивные микозы отличаются агрессивным течением и достаточно высоким уровнем летальности. Одной из таких инфекций является мукормикоз. Следует отметить, что рост распространенности мукормикоза у онкогематологических больных отмечен во всем мире, и именно острые лейкозы становятся основным фоновым заболеванием для данной инфекции в развитых странах [2]. В исследовании, проведенном в 2009 г. A.S. Ibrahim, показано, что осложнение мукормикозом значительно удлиняет пребывание пациента в стационаре, увеличивает нагрузку на службы интенсивной терапии и стоимость лечения почти на 100 тыс. долларов [3]. Причем у этой категории больных летальность в течение 90 дней (от установления диагноза) составила 20–78 % [4, 5].

В настоящее время особенности течения мукормикоза у онкогематологических больных представлены на основании изучения небольших когорт больных [2].

**Цель** данного проспективного исследования – изучение факторов риска, этиологии, клинических проявлений, способов и результатов лечения мукормикоза у онкогематологических больных.

## Материалы и методы

В проведенное авторами статьи проспективное исследование 2004–2016 гг. были включены 84 больных мукормикозом в возрасте от 3 мес до 74 лет (медиана возраста равнялась  $34,5 \pm 15,0$  лет), в том числе дети (27 %) и взрослые (73 %). В этой когорте больных мужчин было больше, чем женщин (56 % vs. 44 %). Кроме демографических сведений, учитывали более 200 показателей: анамнез заболевания и жизни пациентов, данные о наличии факторов риска развития инвазивных микозов, результатах обследования и лечения и др.

Лабораторная диагностика включала микроскопическое и культуральное исследования. Из образцов биосубстратов (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж,

аспират из околоносовых придаточных пазух и др.) готовили препараты в просветляющей жидкости (10 % раствор КОН в 10 % водном растворе глицерина) с добавлением флуоресцирующего маркера (калькофлуор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе, отмечали наличие нитей несептированного мицелия, ветвящихся под углом 90°.

Биопсийный, операционный или секционный материал после фиксации формалином подвергали обезвоживанию и заливали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм. В дальнейшем срезы окрашивали гематоксилином и эозином, проводили PAS-реакцию (periodic acid – Schiff reaction) и окраску по методу Гомори–Грокотта для выявления элементов гриба в тканях.

Для уточнения диагноза с 2013 г. использовали молекулярно-генетическую идентификацию мукормицетов из культур, а также из клинического материала (бронхоальвеолярный лаваж, гистологические препараты).

Для диагностики мукормикоза проводили компьютерную томографию (КТ) легких и придаточных пазух носа в режиме высокого разрешения, магнитную резонансную томографию (МРТ), фибробронхоскопию, плевральные и люмбальные пункции, пункции придаточных пазух носа, а также биопсию тканей и патоморфологические исследования.

Диагностировали мукормикоз и оценивали эффективность лечения на основании критериев Европейской организации по изучению и лечению рака (The European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC) и исследующей микозы группы (Mycoses Study Group, MSG) Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (The National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID) США [6, 7]. Внутрибольничный мукормикоз определяли на основании критериев Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, 1979 г.) с учетом дополнений 1993 г. Мукормикоз считали внутрибольничным, если инфекция развилась через 48 ч и более после поступления в лечебное учреждение, а также если пациент повторно поступал в стационар с установленной инфекцией, явившейся следствием предыдущей госпитализации [8].

Статистический анализ данных выполняли с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 10.1 (StatSoft, Inc., США). Описатель-

ная статистика количественных признаков представлена средними и среднеквадратическими отклонениями (в формате  $M \pm s$ , в случае нормальных распределений) либо медианами и квартилями (в формате  $Me [Q1; Q3]$ ). Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами. Для сравнения 2 несвязанных групп по количественным признакам применялся тест Манна–Уитни. Сравнение несвязанных групп по качественным признакам проводили с использованием теста хи-квадрат и точного критерия Фишера. При проверке гипотез результаты считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Анализ выживаемости проводили по методу Каплана–Мейера с построением графических кривых.

### Результаты

С 2004 по 2016 г. нами были обследованы 59 гематологических и онкологических больных, проходивших лечение в 9 лечебно-профилактических учреждениях, что составило 70 % от общего числа больных мукомикозом. Среди них были 33 (56 %) мужчины и 23 (44 %) женщины в возрасте от 3 до 74 лет (медиана  $27 \pm 15$  лет), а также 21 (36 %) ребенок в возрасте от 3 до 17 лет (медиана  $11 \pm 3$  лет), из них 40 % мальчиков и 60 % девочек.

Установлено, что наиболее часто мукомикоз развивался у пациентов с острыми лейкозами (64 %), реже фоновыми заболеваниями были нейробластома, лимфогранулематоз, неходжкинская лимфома, апластическая анемия, анемия Фанкони, миелодиспластический синдром, миелоидная саркома и миеломная болезнь (табл. 1).

У 93 % онкогематологических больных мукомикоз развивался как внутрибольничная инфекция после длительного нахождения в стационаре ( $n = 55$ ). Следует отметить, что данная инфекция проявлялась в среднем на 37-й день госпитализации (медиана равна  $37 \pm 10$ ). Детей мукомикоз поражал только в стационаре, в то время как у взрослых наблюдали и внебольничный вариант его развития.

Изучение факторов риска показало, что мукомикоз развивался сразу после или во время проведения цитостатической полихимиотерапии, причем преимущественно после 4–5-го курса ее проведения. Длительный агранулоцитоз в течение месяца до диагностики мукомикоза выявляли у 85 % больных, медиана продолжительности агранулоцитоза — 30 дней. Лимфоцитопению определяли несколько реже (75 % больных), медиана продолжительности — 30 дней (табл. 2).

Глюкокортикостероиды (ГКС) получали 2/3 больных, причем половина из них — длительно, в составе иммуносупрессивной терапии по поводу острой и / или хронической реакции «трансплантат против хозяина». Медиана продолжительности применения ГКС составила 48 дней, но следует отметить, что у де-

Таблица 1. Фоновые заболевания у больных мукомикозом

Table 1. Underlying diseases in patients with mucormycosis

Нозология (МКБ-10*) Nosology (ICD-10*)	Всего больных, N = 59, абс (%) Total number of patients, N = 59, total (%)	Число больных, % Number of patients, %	
		среди детей, n = 21 children, n = 21,	среди взрослых, n = 38, adults, n = 38
Острый миелобластный лейкоз Acute myeloid leukemia	23 (39,0)	38	40
Острый лимфобластный лейкоз Acute lymphoblastic leukemia	15 (25,0)	33	21,0
Лимфома Ходжкина Hodgkin's lymphoma	4 (7,0)	0	10,0
Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's Lymphoma	3 (5,0)	0	8,0
Хронический лимфолейкоз Chronic lymphocytic leukemia	3 (5,0)	0	8,0
Нейробластома Neuroblastoma	3 (5,0)	10	2,5
Волосатоклеточный лейкоз Hairy cell leukemia	1 (1,7)	0	2,5
Апластическая анемия Aplastic anemia	1 (1,7)	5	0
Анемия Фанкони Fanconi anemia	1 (1,7)	5	0
Миелодиспластический синдром Myelodysplastic syndrome	1 (1,7)	5	0
Миелоидная саркома Myeloid sarcoma	1 (1,7)	5	0
Миелофиброз Myelofibrosis	1 (1,7)	0	2,5
Хронический миелолейкоз Chronic myeloid leukemia	1 (1,7)	0	2,5
Миеломная болезнь Multiple myeloma	1 (1,7)	0	2,5

\*Международная классификация болезней 10-го пересмотра.

\*The International Classification of Diseases, 10<sup>th</sup> revision

тей она была короче, чем у взрослых. После аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток мукомикоз развивался у 44 % больных (одинаково часто у детей и взрослых), преимущественно в позднем посттрансплантационном периоде (медиана периода после трансплантации до выявления мукомикоза — 127 дней).

Таблица 2. Факторы риска и фоновые состояния у больных мукомикозом при онкогематологической патологии

Table 2. Risk factors and underlying conditions in oncohematology patients with mucormycosis

Факторы риска и фоновые состояния Risk factors and underlying conditions	Всего больных, N = 59, абс (%) Total number of patients, N = 59, total (%)	Число больных, % Number of patients, %	
		среди детей, n = 21 children, n = 21	среди взрослых, n = 38, adults, n = 38
Полихимиотерапия Chemotherapy	54 (93)	100	87
Число курсов полихимиотерапии Number of polychemotherapy courses	4*	4 vs. 5	
Агранулоцитоз Agranulocytosis	50 (85)	91	82
Длительность агранулоцитоза, дни Duration of agranulocytosis, days	30*	35 vs. 20	
Лимфоцитопения Lymphocytopenia	44 (75)	85	69
Длительность лимфоцитопении, дни Duration of lymphocytopenia, days	30*	22 vs. 30	
Глюкокортикостероиды Glucocorticosteroids	39 (66)	67	66
Длительность приема глюкокортикостероидов, дни Duration of glucocorticosteroids, days	48*	21 vs. 50	
Аллогенная трансплантация стволовых кроветворных клеток Allogeneic haematopoietic stem cells transplantation	26 (44)	43	45

\* Медиана.

\*Median.

Следует отметить, что у 52 % больных мукомикоз диагностировали через 1–225 дней после выявления инвазивного аспергиллеза. Причем последний достоверно чаще обнаруживали у взрослых ( $p = 0,03$ ).

Исследование показало, что первичный очаг поражения, как правило, локализовался в легких (73 %) и придаточных пазухах носа (15 %) как у детей, так и у взрослых, а в единичных случаях находился в костной ткани, кишечнике, коже и мягких тканях (табл. 3). Дальнейшее распространение процесса и вовлечение других органов и систем развилось у 42 % больных, причем с одинаковой частотой в разных возрастных группах.

Клинические исследования включали сбор субъективных и объективных данных (запись жалоб, объективный осмотр). Почти у всех (89 %) больных отмечалось повышение температуры тела (более 38,5 °C). При первичном поражении легких сухой кашель, периодами со скудной мокротой, наблюдали у 63 % пациентов, у 32 % из них он сопровождался кровохарканьем. Чуть более половины больных отмечали локальный болевой синдром (53 %) и одышку (51 %). Заболевание протекало одинаково тяжело в разных возрастных группах. При первичном поражении придаточных пазух носа всех больных беспо-

коили локальные боли, признаки кровотечения наблюдали в 73 % случаев. Некроз тканей и характерный черный струп присутствовали у 2/3 больных с поражением придаточных пазух носа (рис. 1). У пациентов с первичным поражением кишечника основными клиническими признаками были симптомы «острого живота», интенсивность которых постепенно нарастала.

Для выявления поражения различных органов и систем пациентам проводили инструментальные исследования — КТ легких (всем больным) и околоносовых придаточных пазух, МРТ, ультразвуковое исследование (рис. 2). У всех больных с поражением легких ( $n = 43$ ) на начальных этапах заболевания выявляли очагово-инфильтративные изменения. В 47 % случаев поражение было односторонним, в 53 % — двусторонним. При этом следует отметить, что из 43 больных в 53 % случаев отмечали наличие гидроторакса, в 40 % — междолевого плеврита. Симптом «серпа» описан у 1/4 пациентов. КТ придаточных пазух носа выполнили 47 % из 43 больных. Признаки синусита определены у 32 %. МРТ головного мозга проводили 32 % больных, у 5 человек выявили очаговые поражения. Достоверных различий в частоте проведения инструментальных методов обследования и описан-

Таблица 3. Локализация мукормикоза у онкогематологических больных

Table 3. Localization of mucormycosis in oncohematological patients

Локализация мукормикоза Localization of mucormycosis	Всего больных, N = 59, абс (%) Total number of patients, N = 59, total (%)	Число больных, % Number of patients, %	
		среди детей, n = 21 children, n = 21	среди взрослых, n = 38, adults, n = 38
Легкие Lung	43 (73)	67	76
Риноцеребральная область Rhino cerebral area	9 (15)	29	8
Желудочно-кишечный тракт Gastrointestinal tract	5 (8)	5	11
Кожа и мягкие ткани Skin and soft tissues	1 (2)	0	2,5
Почка Kidney	1 (2)	0	2,5 %
Два и более органа Two or more organs	25 (42)	43	42



Рис. 1. Некроз тканей («черный струп») при поражении придаточных пазух носа у больной хроническим лимфолейкозом

Fig. 1. Tissues necrosis in patient with chronic lymphocytic leukemia and paranasal sinuses involvement

ных результатах между разными возрастными группами выявлено не было.

Из очагов поражения для микологического исследования с целью идентификации возбудителя заболевания проводили забор материала (биосубстраты: мокрота, промывная жидкость из бронхов, плевральная и спинномозговая жидкости, промывные воды придаточных пазух носа, биоптаты). Наличие ветвящегося под прямым углом несептированного мицелия отмечали у 100 % больных (рис. 3).

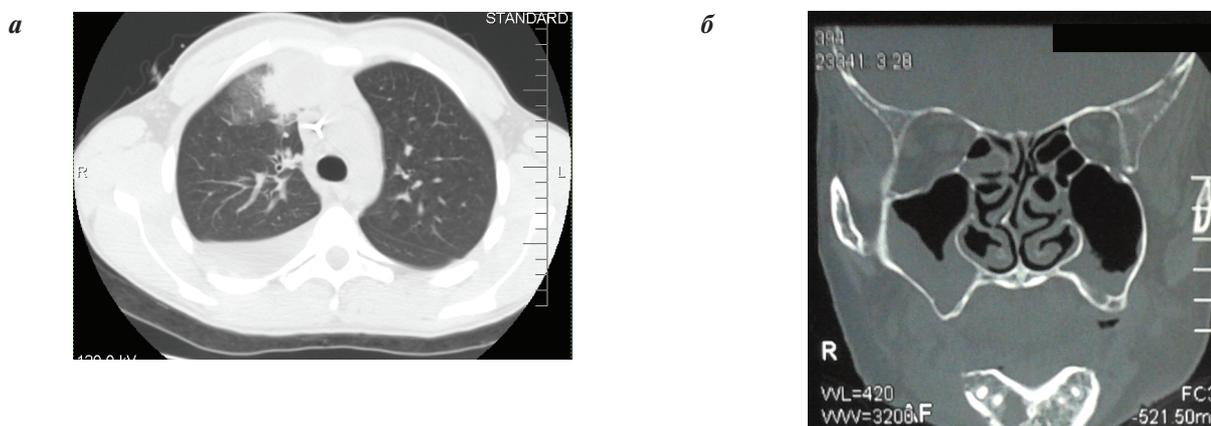
Рост культуры микромицетов был получен у 61 % больных (n = 46): 57 % детей vs. 64 % взрослых. С помощью молекулярно-генетической идентификации

диагноз мукормикоз был подтвержден у 12 больных (33 %). Возбудителями мукормикоза были *Rhizopus* spp. (36 %), *Rhizopus oryzae* (6 %) и *Rhizopus microsporus* (5 %), *Rhizomucor* spp. (14 %) и *Rhizomucor pusillus* (14 %), *Lichtheimia corymbifera* (17 %), а также *Mucor* spp. (8 %). У детей чаще, чем у взрослых, выделяли *Lichtheimia corymbifera* (40 % vs. 7 %), а у взрослых чаще, чем у детей, — *Rhizopus* spp. (33 % vs. 50 %) и *Mucor* spp. (0 % vs. 12 %).

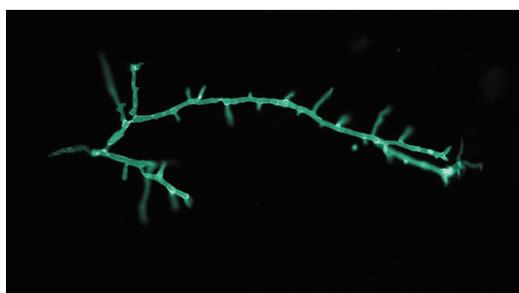
Гистологическое исследование провели у 63 % больных, у 2/3 из них было выполнено исследование биопсийного или послеоперационного материала (64 %), у 1/3 диагноз был подтвержден по данным аутопсии (36 %) (рис. 4).

Антимикотическую терапию мукормикоза получили 78 % больных (n = 46), у 22 % диагноз установлен посмертно (дети — 24 %, взрослые — 21 %). Позаконазол (детям 15–20 мг/кг/сут, взрослым 800 мг/сут) принимали 63 % больных, липидный комплекс амфотерицина В (АмВ) (3–5 мг/кг/сут) — 52 %, каспофунгин (дети — 70 мг/м<sup>2</sup> в 1-е сутки, затем 50 мг/м<sup>2</sup>/сут; взрослые — 70 мг в 1-е сутки, затем 50 мг/сут) — 46 %, амфотерицин В (1–1,5 мг/кг/сут) — 43 %. Почечная недостаточность развилась в 33 % случаях после терапии АмВ, что потребовало отмены или снижения дозы препарата. Комбинированную терапию (каспофунгин и АмВ, каспофунгин и липидный комплекс АмВ, каспофунгин и позаконазол) получали 54 % больных. Медиана продолжительности антимикотического лечения составила 70 дней, комбинированного антимикотического лечения — 24 дня. Особенности антимикотической терапии у детей и взрослых приведены в табл. 4.

У 47 % больных (29 % детей, 44 % взрослых) применение антимикотиков сочетали с хирургическим



**Рис. 2.** Компьютерные томограммы: а – органов грудной полости больного мукормикозом на фоне апластической анемии, б – придаточных пазух носа у больной хроническим лимфолейкозом  
**Fig. 2.** Computerized tomography scans: a – the chest in aplastic anemia patient with mucormycosis, б – paranasal sinuses in patient with chronic lymphatic leukemia



**Рис. 3.** Микроскопия биоптата слизистой придаточных пазух носа у больной хроническим лимфолейкозом  
**Fig. 3.** Microscopy of the biopsy samples of the paranasal sinuses mucosa in patient with chronic lymphatic leukemia

лечением (лобэктомия, резекция ребер, синусотомия, резекция кишечника, некрэктомия кожи и мягких тканей, нефрэктомия).

Основным критерием оценки эффективности лечения мукормикоза считали общую выживаемость больных в течение 3 мес. При проведении антимикотической терапии она составила 59 %: 50 % у детей и 70 % у взрослых (рис. 5).

За последние 5 лет отмечена тенденция к увеличению общей выживаемости онкогематологических больных мукормикозом (рис. 6). Установлено, что выживаемость у таких больных достоверно снижается при длительном агранулоцитозе (35 % vs. 68 %,

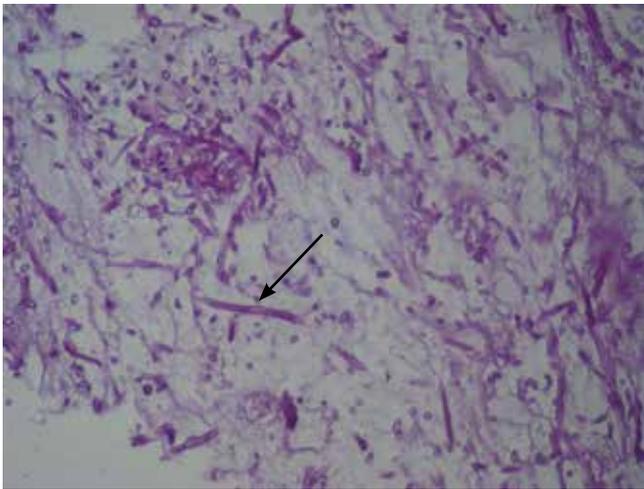
**Таблица 4.** Антимикотическая терапия мукормикоза у онкогематологических больных

**Table 4.** Antifungal therapy of mucormycosis in oncohematological patients

Антимикотические препараты Antifungal drugs	Всего больных, N = 46, абс (%) Total number of patients, N = 46, total (%)	Число больных, % Number of patients, %	
		среди детей, n = 16 children, n = 16	среди взрослых, n = 30, adults, n = 30
Позаконазол Posaconazole	29 (63)	56	69
Липидный комплекс амфотерицина В Amphotericin B lipid complex	24 (52)	81	38*
Каспофунгин Caspofungin	21 (46)	50	45
Амфотерицин В деоксихолат Amphotericin B deoxycholate	20 (43)	12	62**
Комбинированная терапия Combined therapy	25 (54)	75	45
Медиана продолжительности общего курса антимикотической терапии, дни Median of antifungal therapy duration, days	70 (±20)	54 (±18)	74 (±20)

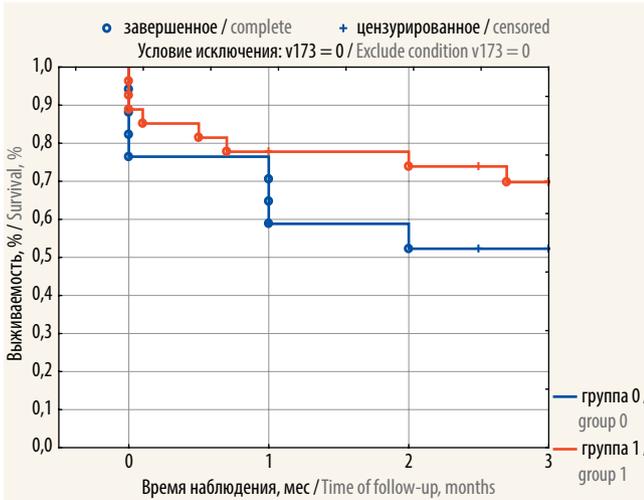
\* $p = 0,005$ .

\*\* $p = 0,006$ .



**Рис. 4.** Гистологическое исследование ткани легкого у больного апластической анемией; PAS-реакция;  $\times 600$ . Визуализируются широкие нити несептированного мицелия

**Fig. 4.** Histological examination of lung tissue in aplastic anemia patient. PAS reaction;  $\times 600$ . The wide strands of the unseptated mycelium are visualized



**Рис. 5.** Общая выживаемость в течение 3 мес онкогематологических больных с мукормикозом, получавших антимикотическую терапию,  $N = 46$ : группа 0 – дети,  $n = 16$ ; группа 1 – взрослые,  $n = 30$ . Условие исключения:  $v173 = 0$  (исключены те пациенты, у которых не обнаружен данный признак, т.е. те, кто умер и не получал антимикотическую терапию)

**Fig. 5.** 3-months overall survival in patients with mucormycosis received antifungal therapy,  $n = 46$ : group 0 – children,  $n = 16$ ; group 1 – adults,  $n = 30$  Exclude condition:  $v173=0$  (excluded those patients who have not detected the symptom, i.e. those who died and did not receive antimycotic therapy)

$p = 0,03$ ), продолжительном применении ГКС (33 % vs. 67 %,  $p = 0,044$ ), распространенном (диссеминированном) мукормикозе (29 % vs. 71 %,  $p = 0,002$ ), развитии кровохарканья (35 % vs. 79 %,  $p = 0,01$ ), а также при двустороннем поражении легких с развитием гидроторакса (30 % vs. 62 %,  $p = 0,054$ ). Прогноз при развитии мукормикоза достоверно улучшается при ремиссии основного заболевания, а также при применении комбинированной антимикотической терапии (40 % vs. 59 %,  $p = 0,01$ ).



**Рис. 6.** Выживаемость онкогематологических больных мукормикозом в течение 3 мес: группа 1 – с 2004 по 2010 г., группа 2 – с 2011 по 2016 г. Условие исключения:  $v172 = 0$  (исключены те пациенты, у которых не обнаружен данный признак, т.е. те, кто умер и не получал антимикотическую терапию)

**Fig. 6.** 3-months survival of oncohematological patients with mucormycosis (group 1 – from 2004 to 2010; group 2 – from 2011 to 2016). Exclude condition:  $v172=0$  (excluded those patients who have not detected the symptom, i.e. those who died and did not receive antimycotic therapy)

### Обсуждение

Мукормикоз – тяжелый оппортунистический микоз, поражающий преимущественно онкогематологических больных. Его распространенность среди данной категории больных в последние годы увеличилась, что подтверждается международными исследованиями [9–11]. По результатам нашего исследования также наблюдается рост случаев мукормикоза, причем большей частью у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Если в начале 2000-х мы регистрировали 1 случай мукормикоза в 1–2 года, то с начала 2010-х его число уже превысило 10 случаев в год.

В ряде зарубежных исследований продемонстрировано, что мукормикоз развивается преимущественно у больных острыми лейкозами [12–16]. Мы также показали, что острые лейкозы были фоновыми заболеваниями у 64 % больных.

У детей мукормикоз развивается в основном на фоне онкогематологической патологии [17]. В европейских исследованиях основным фоновым заболеванием у детей чаще всего отмечается острый миелоидный лейкоз (45 % всех больных), в аналогичном исследовании, проведенном в США, около 70 % – это больные острым лейкозом [18, 19]. В группе наблюдаемых нами детей острые лейкозы также составили 64 % среди фоновых заболеваний.

Клинические и экспериментальные наблюдения, посвященные мукормикозу, демонстрируют, что основным фактором риска, играющим решающую роль в патогенезе заболевания, являются повреждения гранулоцитов (качественные и количественные) и нарушение фагоцитарного звена иммунного ответа [20]. Наше исследование подтвердило, что мукормикоз

развивался у больных во время или непосредственно после полихимиотерапии на фоне длительного (более 30 дней) агранулоцитоза.

Результаты нашего исследования, а также данные литературы свидетельствуют, что у онкогематологических больных наиболее частой клинической формой мукормикоза является поражение легких (50–81 %) [2, 11–13]. В то же время у детей чаще развивается риноцеребральный мукормикоз (29 % vs 8 %).

Диагностика мукормикоза у онкогематологических больных – трудная задача. Методы диагностики (эффективные серологические и метод полимеразной цепной реакции) не разработаны, необходимы повторные микологические исследования материала из очагов поражения, что часто трудновыполнимо ввиду тяжести состояния пациентов. Мы диагностировали мукормикоз посмертно у 22 % больных, что сопоставимо с результатами зарубежных исследований [9–11].

Микроскопические признаки этого заболевания в материале из очагов поражения обнаружили у всех больных. Результаты посевов были позитивными у 61 % пациентов, что совпадает с зарубежными данными [9–11]. В результате микологического обследования у онкогематологических больных определили возбудителей болезни – *Rhizopus* spp. (47 %), *Rhizomucor* spp. (28 %), *Lichtheimia corymbifera* (17 %) и *Mucor* spp. (8 %). У детей мы чаще выделяли *Lichtheimia corymbifera*, а у взрослых – *Rhizopus* и *Mucor* spp. Спектр возбудителей сходен с аналогичными данными в опубликованных европейских исследованиях [2, 9–11].

Согласно современным международным рекомендациям, обязательными условиями успешного лечения мукормикоза у онкогематологических больных являются ранняя высокодозная противогрибковая терапия в сочетании с активным хирургическим удалением пораженных тканей, а также устранение или уменьшение выраженности факторов риска (контроль основного заболевания, коррекция нейтропении, отмена ГКС и пр.) [21].

Для стартовой терапии рекомендовано применение липидных форм АмВ, из которых в нашей стране доступен только липидный комплекс АмВ, его использование возможно в комбинации с каспофунгином [21].

Позаконазол – единственный зарегистрированный в нашей стране пероральный препарат, активный против возбудителей мукормикоза. Позаконазол рекомендовано применять после стабилизации состояния пациента, а также при невозможности стартовой терапии липидным АмВ [21]. В связи с выраженной нефротоксичностью АмВ деоксихолат является

альтернативным препаратом. В нашем исследовании почти у половины больных (преимущественно взрослых) использовали АмВ деоксихолат в качестве стартовой терапии, при этом почечная недостаточность развилась у 33 % пациентов, что потребовало отмены или снижения дозы препарата.

В настоящем исследовании применение комбинированной терапии, наряду с ремиссией фонового заболевания, было статистически достоверным прогностическим фактором, что совпадает с ранее полученными результатами [22]. Поэтому лечение мукормикоза у онкогематологических больных надо начинать с применения липидного комплекса АмВ в сочетании с каспофунгином, а после стабилизации состояния пациента использовать позаконазол.

### Выводы

1. Пациенты с гематологическими и онкологическими заболеваниями (наиболее часто с острым миелоидным и острым лимфобластным лейкозами) составляют 70 % всех больных мукормикозом.
2. У онкогематологических больных мукормикоз развивается на фоне длительного (медиана – 30 дней) агранулоцитоза и лимфоцитопении после интенсивной цитостатической и / или иммуносупрессивной терапии, а также трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
3. Возбудители мукормикоза у онкогематологических больных – это *Rhizopus* spp. (47 %), *Rhizomucor* spp. (28 %), *Lichtheimia corymbifera* (17 %) и *Mucor* spp. (8 %). У детей чаще выделяли *Lichtheimia corymbifera*, у взрослых – *Rhizopus* и *Mucor* spp.
4. Заболевание начинается с поражения легких (73 %) и придаточных пазух носа (15 %), дальнейшее вовлечение других органов и систем выявили у 44 % пациентов.
5. Противогрибковые препараты (позаконазол, липидный комплекс АмВ, каспофунгин, амфотерицин В) получали 78 % больных, хирургическое лечение – 47 %. Общая выживаемость пациентов в течение 3 мес составила 59 %.
6. Обязательными условиями успешного лечения мукормикоза являются ранняя высокодозная антифунгальная терапия в сочетании с активным хирургическим удалением пораженных тканей, а также контроль основного заболевания, коррекция нейтропении и отмена ГКС. Препарат выбора для стартовой терапии – липидный комплекс АмВ в сочетании с каспофунгином, для продолжения лечения – позаконазол.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Klimko N., Kozlova Y., Khostelidi S. et al. The burden of serious fungal diseases in Russia. *Mycoses* 2015;58(5):58–62. DOI: 10.1111/myc.12388.
- Petrikkos G., Skiada A., Drogari-Apiranthitou M. Epidemiology of mucormycosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(6):67–73. DOI: 10.1111/1469-0691.12563.
- Ibrahim A.S., Edwards JE Jr, Bryant R., Spellberg B. Economic burden of mucormycosis in the United States: can a vaccine be cost-effective? *Med Mycol* 2009;47(6):592–600. DOI: 10.1080/13693780802326001.
- Hammond S.P., Baden L.R., Marty F.M. Mortality in hematologic malignancy and hematopoietic stem cell transplant patients with mucormycosis, 2001 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(11):5018–21. DOI: 10.1128/AAC.00536-11.
- Zilberberg M.D., Shorr A.F., Huang H. et al. Hospital days, hospitalization costs, and inpatient mortality among patients with mucormycosis: a retrospective analysis of US hospital discharge data. *BMC Infect Dis* 2014;14:310. DOI: 10.1186/1471-2334-14-310.
- De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813–21. DOI: 10.1086/588660.
- Segal B., Herbrecht R., Stevens D. et al. Defining Responses to Therapy and Study Outcomes in Clinical Trials of Invasive Fungal Diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer Consensus Criteria. *Clin Infect Dis* 2008;47(5):674–683. DOI: 10.1086/590566.
- Ducel G., Fabry J., Nicolle L. Prevention of hospital-acquired infections. Geneva: World Health Organization, 2002.
- Skiada A., Pagano L., Groll A. et al. European Confederation of Medical Mycology Working Group on Zygomycosis. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(12):1859–67. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03456.x.
- Petrikkos G., Skiada A., Lortholary O., Roilides E. et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012;54(1):23–34. DOI: 10.1093/cid/cir866.
- Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G. et al. A Global Analysis of Mucormycosis in France: The RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis* 2012;54(1):35–43. DOI: 10.1093/cid/cir880.
- Hu R., Jiang X., Wu Y. Risk factors for invasive pulmonary fungal infection in patients with hematological malignancies not receiving hematopoietic stem cell transplant. *Neoplasma* 2012;59(06):669–675. DOI: 10.4149/neo\_2012\_085.
- Bitar D., Van Cauteren D., Lanternier F. et al. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis) in France, 1997–2006. *Emerg Infect Dis* 2009;15(9):1395–401. DOI: 10.3201/eid1509.090334.
- Neofytos D., Horn D., Anaissie E. et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009;48(3):265–273. DOI: 10.1086/595846.
- Garcia-Vidal C., Upton A., Kirby K.A., Marr K.A. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Infect Dis* 2008;47(8):1041–50. DOI: 10.1086/591969.
- Kontoyiannis D.P., Marr K.A., Park B.J. et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010;50(8):1091–100. DOI: 10.1086/651263.
- Prasad P., Vaughan A., Zaoutis T. Trends in zygomycosis in children. *Mycoses* 2011;55(4):352–356. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2011.02124.x.
- Däbritz J., Attarbaschi A., Tintelnot K. et al. Mucormycosis in paediatric patients: demographics, risk factors and outcome of 12 contemporary cases. *Mycoses* 2011;54(6):e785–e788. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2011.02025.x.
- Phulpin-Weibel A., Rivier A., Leblanc T. et al. Focus on invasive mucormycosis in paediatric haematology oncology patients: a series of 11 cases. *Mycoses* 2012;56(3):236–240. DOI: 10.1111/myc.12010.
- Ibrahim A., Spellberg B., Walsh T., Kontoyiannis D. Pathogenesis of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012;54(1):16–22. DOI: 10.1093/cid/cir865.
- Tissot F., Agrawal S., Pagano L. et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica* 2017;102(3):433–444. DOI: 10.3324/haematol.2016.152900.
- Klimko N., Khostelidi S., Volkova A. et al. Mucormycosis in haematological patients: case report and results of prospective study in Saint Petersburg, Russia. *Mycoses* 2014;57(1):91–96. DOI: 10.1111/myc.12247.

## Успешное применение брентуксимаба ведотина в терапии прогрессии периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной у пожилой пациентки

Л.Г. Горенкова, С.К. Кравченко, Е.Е. Клебанова, К.И. Данишян, М.А. Силаев, А.М. Ковригина,  
Н.В. Рыжикова, Н.И. Скидан, М.А. Цейтлина, В.Г. Савченко

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Лилия Гамилевна Горенкова l.aitova@mail.ru

Периферическая Т-клеточная лимфома неспецифицированная – редко встречающаяся подгруппа лимфом. Заболевание обнаруживается преимущественно у лиц старшей возрастной группы, нередко с экстранодальной локализацией, в том числе на коже и в мягких тканях. Для верификации диагноза необходимо выполнение гистологического и иммуногистохимического исследования, по данным которого, помимо экспрессии других Т-клеточных антигенов (CD2, CD4, CD5, CD7), наблюдается экспрессия активационного антигена CD30 в различных соотношениях (не менее 10 %, не более 80 %). В выборе режима индукции у лиц старшей возрастной группы при отягощенном кардиальном анамнезе предпочтительны неантрациклинсодержащие курсы химиотерапии. Однако, несмотря на их невысокую интенсивность, лечение пожилых пациентов сопряжено с высоким риском развития осложнений. Применение новых препаратов (моноклональные антитела, эпигенетические агенты) в сочетании с полихимиотерапией открывает возможность успешного лечения, в том числе для пациентов старше 65 лет, и является перспективным для изучения направлением.

В приведенном клиническом случае терапии периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной отмечалось первично-рефрактерное течение заболевания. Значимый клинический ответ (полная ремиссия) был получен в результате таргетной терапии препаратом брентуксимабом ведотином, содержащим CD30 – моноклональное антитело и новое антимиотическое соединение – монометилауристатин Е, и при этом без постхимиотерапевтических осложнений.

При развитии неоднозначной ситуации (увеличение размеров одного из опухолевых очагов при регрессии других, присутствие признаков инфекции – гиперемии, перифокального отека, распространения зоны некроза) необходима гистологическая верификация для подтверждения прогрессирования заболевания.

**Ключевые слова:** периферическая Т-клеточная лимфома, лечение пожилых пациентов, рефрактерное течение, брентуксимаб ведотин, полная ремиссия

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-23-29

### Successful use of brentuximab vedotin in the treatment of progressive peripheral unspecified T-cell lymphoma in an elderly female patient

L.G. Gorenkova, S.K. Kravchenko, E.E. Klebanova, K.I. Danishyan, M.A. Silaev, A.M. Kovrigina,  
N.V. Rizikova, N.I. Skidan, M.A. Ceitlina, V.G. Savchenko

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 125167, Russia

Peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified (PTCL-NOS) is a rare subgroup of lymphomas. This disease is predominantly found in older people and often has extranodal involvement including skin and soft tissues. To verify the diagnosis, it is necessary to perform histological and immunohistochemical tests, which show the expression of CD30 activation antigen in different proportions (less than 10 %, not more than 80 %) in addition to the expression of other T-cell antigens (CD2, CD4, CD5, CD7). When choosing the induction regimen in older people with relevant cardiac history, it is preferable to use non-anthracycline-containing chemotherapy courses. However, despite the low intensity of such regimens, treatment of elderly patients is associated with high risk of side effects. Using new drugs (monoclonal antibodies, epigenetic agents) in combination with polychemotherapy is a promising direction opening a possibility of successful management for all patients including those older than 65 years.

In the described clinical case of PTCL-NOS, the patient had primary refractory disease. Significant clinical response (complete remission) was achieved as a result of targeted therapy with brentuximab vedotin containing anti-CD30 chimeric antibody conjugated to a microtubule-disrupting agent (monomethyl auristatin E) without toxicity and any infections.

In case of ambiguous situation (an increase in the size of one of the tumor sites with regression of others, signs of infection – hyperemia, perifocal edema, the spread of the necrosis zone), histological verification is necessary to confirm the disease progression.

**Key words:** peripheral T-cell lymphoma, treatment of elderly patients, refractory disease, brentuximab vedotin, complete remission

**Введение**

Периферическая Т-клеточная лимфома неспецифицированная — это гетерогенная группа зрелых Т-клеточных лимфом, которые по своим гистологическим и иммунофенотипическим особенностям невозможно классифицировать как другие нозологические подгруппы, и, таким образом, является диагнозом исключения. Среди общей группы нодальных Т-клеточных лимфо-пролиферативных заболеваний частота ее встречаемости составляет около 30–40 %, что соответствует примерно 1–1,5 случая заболевания на миллион населения в год [1–3].

Для данной лимфомы, которая чаще встречается у лиц старшей возрастной группы (медиана возраста — 60 лет), характерна высокая частота экстра nodальных поражений, в том числе кожи [4–6]. У нее, как и у других Т-клеточных лимфом, отмечается агрессивное клиническое течение — около 2/3 больных на момент верификации диагноза относятся к группе промежуточно-высокого или высокого риска по международному прогностическому индексу.

Для верификации диагноза необходимо проведение гистологического исследования, при котором выявляется диффузный рост опухолевого субстрата с плеоморфным составом (атипичные клетки могут быть как мелкого, среднего, так и крупного размера). Иммунофенотип периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной вариабелен: чаще это CD4-позитивные опухоли; если клетки экспрессируют CD8 (около 15–40 % случаев), то характерен цитотоксический иммунофенотип [7]; встречаются и двойные, как негативные (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), так и позитивные (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), варианты. Среди других Т-клеточных маркеров на опухолевых клетках чаще экспрессированы CD5, CD7, реже CD2, CD3. Лимфома чаще клональна по β-цепи Т-клеточного рецептора. Экспрессия активационного антигена CD30 характерна для данной нозологической группы и представлена в разных пропорциональных соотношениях — от низкой (менее 10 %) до высокой (менее 80 %) [8].

Полное геномное секвенирование не выявило значимых мутаций, а также специфических цитогенетических нарушений для периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной, для которой характерно комплексное нарушение кариотипа [9].

При выборе терапии индукции используют антрациклинсодержащие режимы — СНОР (циклофосфамид, гидроксиданорубицин, онковин, преднизон)/СНОЕР (то же с добавлением этопозида). Согласно рекомендациям Национальной онкологической сети США 2017 г. (National Comprehensive Cancer Network, NCCN; <https://education.nccn.org/node/80362>) и Российским клиническим рекомендациям [10] применяют следующую тактику: при развитии общего ответа у молодых сохраненных пациентов проводят консолидацию высокодозной химиотерапией (ХТ) и трансплантацией аутологичных стволовых клеток крови. В том случае, когда

трансплантацию выполнить невозможно, назначают поддерживающую терапию, предлагают участие в клинических исследованиях либо наблюдение (согласно рекомендациям NCCN Guidelines Version 2.2017) [10]. Схожая терапевтическая тактика применима при прогрессировании и / или рецидиве заболевания:

- пациентам моложе 60 лет при сохранении химиочувствительности опухоли в терапии 2-й линии по программам DHAP (дексаметазон, цитозар, цисплатин)/ICE (вепезид, ифосфамид, карбоплатин)/GemOx (гемцитабин, оксалиплатин) рекомендовано проведение трансплантации аллогенного костного мозга;

- пациентам старшей возрастной группы и / или при отягощенном соматическом статусе проводят различные программы с включением гемцитабина, при отсутствии же общего ответа — паллиативную терапию или включают их в различные клинические исследования [11–13].

В терапии индукции (курсы по программам СНОР/СНОЕР) можно добиться не более 30 % бессобытийной выживаемости (БСВ) [1, 14, 15]. По данным многоцентровых рандомизированных исследований, проведение любых высокодозных курсов ХТ не приводит к увеличению БСВ, снижая при этом медиану общей выживаемости (ОВ) за счет увеличения токсического эффекта [16–18].

Новым и перспективным направлением для повышения эффективности лечения, открывающим также новые горизонты в терапии пожилых пациентов, является добавление к антрациклинсодержащим режимам моноклональных антител и / или новых эпигенетических препаратов, зарегистрированных в качестве потенциально эффективных для лечения Т-клеточных лимфом (ромидепсин, белинонат, пралатрексат, алисертиб) [19–21].

Согласно опубликованным результатам проспективного рандомизированного исследования с включением 116 пожилых пациентов (возраст 61–80 лет) по сравнительной эффективности курсов ХТ по программам СНОР и СНОР+ алемтузумаб (моноклональное анти-CD52 антитело) при сравнимой БСВ 29 и 26 % соответственно, получено снижение ОВ (56 и 38 % соответственно), что свидетельствует о высокой токсичности алемтузумаба без повышения эффективности комбинированной терапии [22].

Брентуксимаб ведотин (анти-CD30-моноклональное антитело, конъюгированное с монометилауристатином E) зарегистрирован на территории Российской Федерации в феврале 2016 г. Препарат впервые показал высокую эффективность в терапии рецидивов и / или рефрактерных форм анапластической крупноклеточной лимфомы. В настоящее время область его применения значимо расширяется. На сайте Международного реестра клинических исследований Национального института здоровья США ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) уже более 39 исследований. Эффективность брентуксимаба ведотина оценивается:

– как в монотерапии всех CD30<sup>+</sup> лимфом, так и в сочетании с другими таргетными препаратами (+ кризотиниб для анапластической АЛК<sup>+</sup> лимфомы);

– в качестве поддерживающего лечения после аллогенной трансплантации для пациентов из группы высокого риска;

– в комбинации с курсом ХТ по программе СНОР для терапии 1-й линии CD30-позитивных нодальных Т-клеточных лимфом (исследование ECHELON-2 и многие другие [5, 23–25]).

Получены результаты II фазы открытого многоцентрового исследования монотерапии брентуксимабом ведотином в рецидивах и / или прогрессии Т-клеточных лимфом: работа выполнена с включением 35 пациентов старшей возрастной группы (медиана возраста – 64 года), общий ответ составил 64 % (в группе ангиоиммуобластной Т-клеточной лимфомы – 52 %). В данном исследовании авторами было отмечено интересное событие – показатель клинического ответа не зависел от уровня экспрессии антигена CD30 (что пока остается не изученным) и одним из предположений является воздействие нометилауристатина Е в достаточной концентрации на соседние CD30-негативные опухолевые клетки [26].

При выборе режима индукции ремиссии для пожилых больных, как правило, с отягощенным соматическим статусом (в том числе с кардиальным анамнезом) предпочтительно использование неантрациклинсодержащих режимов ХТ. Исследование Ассоциации гематологов Южной Кореи показало отсутствие достоверной разницы в БСВ у пациентов, получивших курсы ХТ по программам с включением антрациклиновых антибиотиков и без них [27].

Опубликованные результаты 2-й фазы клинического исследования неантрациклинсодержащего ре-

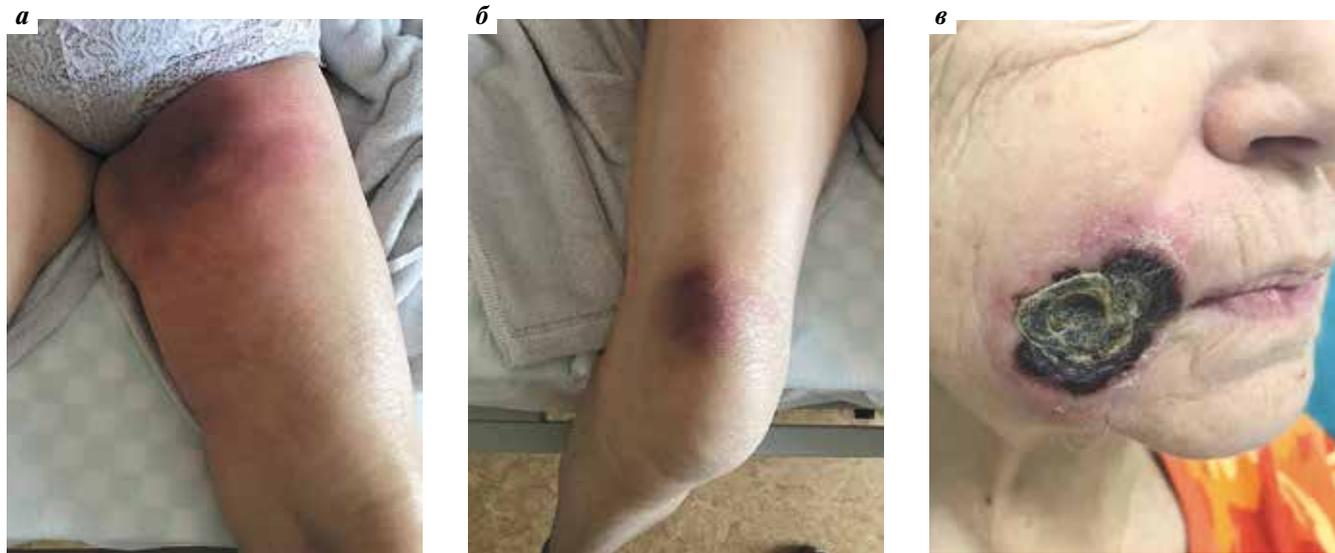
жима ХТ (иринотекан + митоксантрон + дексаметазон) в терапии рецидивов и / или рефрактерных форм периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной у пациентов старшей возрастной группы (возраст 70–79 лет) показали отсутствие летальных осложнений, связанных с проведением ХТ, а уровень общего ответа составил 60 % [28].

Приводим описание клинического случая успешной таргетной терапии прогрессии периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной у пожилой больной.

#### Клинический пример

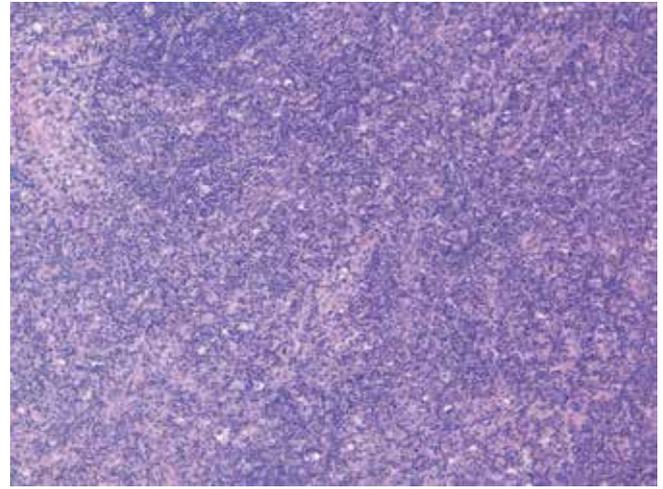
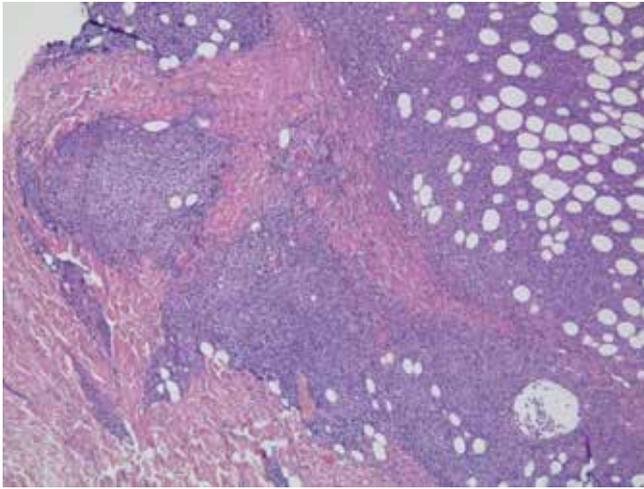
**Пациентка С., 70 лет, с февраля 2016 г. отметила ухудшение самочувствия в виде снижения массы тела на 10 кг и появление подкожных болезненных образований. Длительно (7–8 мес) получала симптоматическую неэффективную терапию у аллерголога. В сентябре 2016 г. в связи с нагноением одного из образований на боковой поверхности грудной клетки в отделении гнойной хирургии областной больницы выполнено иссечение гнойной раны, материал отправлен в том числе на гистологическое исследование, по данным которого заподозрено Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание.**

**В начале ноября 2016 г. пациентка госпитализирована в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России с выраженным интоксикационным синдромом (специфическая фебрильная лихорадка, профузная ночная потливость, снижение массы тела), распространенной лимфаденопатией (вовлечение внутрибрюшных, подвздошных, паховых лимфатических узлов), а также с наличием кожно-мягкотканых образований (на передней поверхности левого бедра, инфильтрат в надколенной области, образование мягких тканей правой щечной области) (рис. 1).**



**Рис. 1.** Кожно-мягкотканые образования до лечения: а – локализация на передней поверхности левого бедра; б – инфильтрат в надколенной области; в – образование мягких тканей правой щечной области

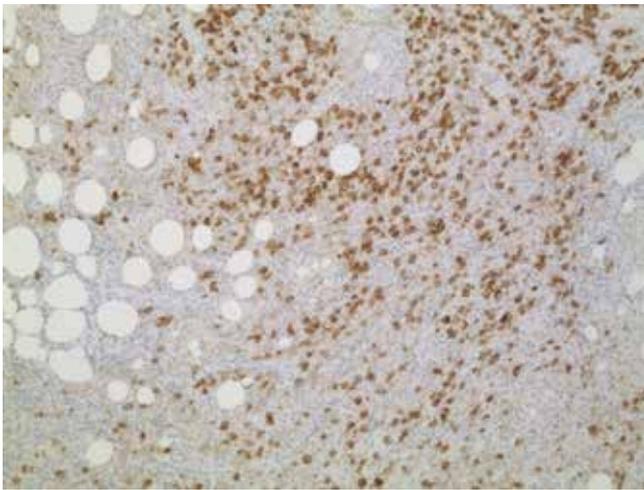
**Fig. 1.** Soft-tissue masses before treatment: a – mass, localized on the anterior surface of the left thigh; б – patellar infiltrate; в – soft-tissue mass in the right buccal region



**Рис. 2.** Гистологическое исследование биоптата: а – кожного образования,  $\times 50$ ; б – лимфатического узла,  $\times 50$   
**Fig. 2.** Histological examination of the biopsy specimens: а – biopsy specimen of the skin lesion,  $\times 50$ ; б – biopsy specimen of the lymph node,  $\times 50$

Была выполнена повторная биопсия пахового лимфатического узла и кожного образования: при гистологическом исследовании последнего выявлен диффузный инфильтрат в дерме и гиподерме из атипичных клеток преимущественно среднего размера, а также из крупных клеток. Идентичная картина выявлена и в лимфатическом узле (рис. 2а, б). По данным иммуногистохимического исследования определен иммунофенотип опухоли:  $CD4^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD3^+$ . Активационный антиген  $CD30$  мономорфно экспрессирован (мембранная, цитоплазматическая, dot-like реакция) в большем количестве опухолевых клеток, в том числе и на крупных – примерно 60–70 % (рис. 3). Отсутствует экспрессия В-клеточных маркеров ( $CD20$  и др.), ALK (киназа анапластических лимфом). Индекс пролиферативной активности составлял около 40–50 %.

Как в биоптате кожного образования, так и в лимфоузле выявлен идентичный опухолевый клон по генам гамма-цепи Т-клеточного рецептора.



**Рис. 3.** Иммуногистохимическое исследование: экспрессия активационного антигена  $CD30$  на опухолевых клетках,  $\times 100$   
**Fig. 3.** Immunohistochemical examination:  $CD30$  activation antigen expression on tumor cells,  $\times 100$

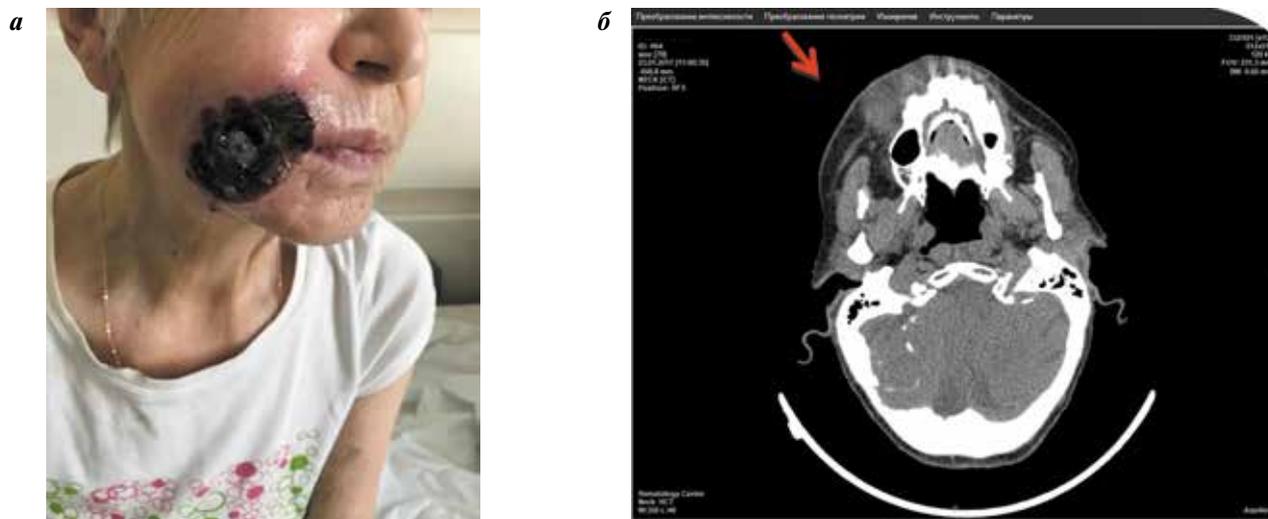
При выборе индукционной терапии 1-й линии решено остановиться на неантрациклинсодержащем режиме ХТ, учитывая длительный кардиальный анамнез и высокий риск сердечно-сосудистых осложнений. После курса ХТ (40 мг дексаметазона, 8 мг/м<sup>2</sup> митоксантрона, 25 мг/м<sup>2</sup> иринотекана) отмечено развитие следующих осложнений: в период миелотоксической цитопении  $Gr^+$  сепсиса (возбудитель *Staphylococcus hominis*), некротической энтеропатии с болевым синдромом, частым жидким стулом и потерей массы тела на 30 %. В результате проведенного курса ХТ получен противоопухолевый ответ в виде сокращения размеров лимфатических узлов на 35–42 % и частичной регрессии кожных образований.

Учитывая развитие серьезных осложнений после курса ХТ и достаточный специфический эффект, пациентке было решено провести 2-й идентичный курс с редукцией дозы глюкокортикостероидных гормонов, а также выполнить введение внутривенных иммуноглобулинов для профилактики инфекционных осложнений. Серьезных побочных эффектов после 2-го курса ХТ не отмечено.

На 15-й день перерыва после 2-го курса ХТ верифицировано прогрессирование заболевания: возврат В-симптомов, увеличение образования правой щечной области с распространением зоны некроза, появление новых и рост ранее вовлеченных лимфатических узлов в брюшной полости.

С учетом возраста пациентки, соматического статуса, серьезных осложнений, полученных после столь неинтенсивного курса ХТ, быстрого прогрессирования заболевания, выбор даже паллиативного режима в данной клинической ситуации был существенно ограничен.

Принимая во внимание высокую экспрессию антигена  $CD30$ , мы решили осуществить попытку таргетной терапии в момент прогрессирования заболевания. Выполнено введение брентуксимаба ведотина в дозе 1,8 мг/кг (в пересчете на массу тела – 90 мг).

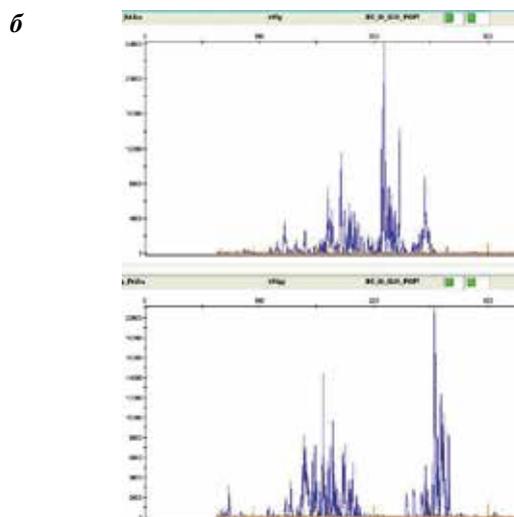
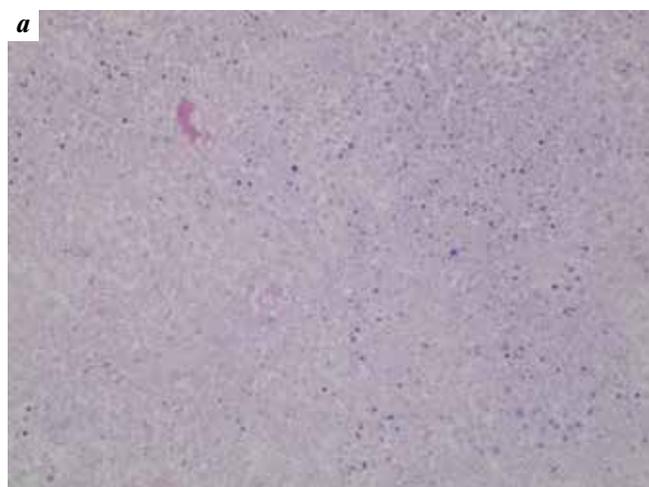


**Рис. 4.** Рост образования щечной области с распространением зоны некроза: а – внешний вид; б – снимок компьютерной томографии  
**Fig. 4.** Growth of the buccal mass with the expansion of necrosis area: a) appearance; б) CT scan

Через 7 дней оценена первая точка контроля – регрессировала специфическая лихорадка, полностью регрессировали внутрибрюшные лимфатические узлы и сократились размеры периферических лимфатических узлов. Однако на фоне противоопухолевого ответа по другим локализациям образование мягких тканей правой щеки продолжало увеличиваться в размерах, распространялась зона некроза, что подтверждалось на компьютерной томограмме, однако уже на тот момент при ультразвуковом исследовании кровотоков не регистрировался (рис. 4а, б).

С целью прекратить рост образования правой щечной области и с учетом отсутствия прогрессии других опухолевых очагов экстренно была начата локальная лучевая терапия. Суммарно выполнено 8 сеансов дистанционной гамма-терапии с суммарной

очаговой дозой 16,2 Гр. Однако отмечались дальнейший рост зоны некроза, увеличение перифокального отека и распространение гиперемии, появилось гнойное отделяемое. Была выполнена первичная хирургическая обработка раны: биоптат отправлен на бактериологическое исследование, где выделена  $G^+$  флора (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*). Во время хирургической обработки произведена глубокая биопсия для оценки состояния опухоли. При гистологическом исследовании лимфоидная инфильтрация не выявлена, имелись зоны с тотальными явлениями некроза. При молекулярно-генетическом исследовании присутствовала картина поликлональности (рис. 5а, б), ранее определяемый моноклон обнаружен не был. Таким образом, развившаяся картина постепенного



**Рис. 5.** Исследование биоптата образования: а – гистологическое: в зоне некроза отсутствует лимфоидная инфильтрация; б – молекулярно-генетическое: картина поликлональности  
**Fig. 5.** Examination of the biopsy specimen of the mass: a) histological examination: there is no lymphoid infiltration in the necrotic zone; б) molecular genetic testing: polyclonal pattern

увеличения образования щечной области после 1-го введения брентуксимаба ведотина была расценена как распад опухоли с сопутствующими симптомами инфекции мягких тканей.

Из-за больших размеров гнойно-некротического дефекта было решено проводить поэтапно некрэктомию с санационными перевязками и местной антибактериальной терапией. В результате отмечалась постепенная положительная динамика – отсутствовал перифокальный отек, регрессировал болевой синдром, нормализовалась температура тела, стали появляться вялые грануляции. Пациентка выписана под амбулаторное наблюдение.

Принимая во внимание выраженный специфический эффект моноклонального анти-CD30 антитела, одновременно выполнено еще 2 введения брентуксимаба ведотина с периодичностью раз в 21 день без побочных эффектов, что позволило проводить терапию в амбулаторном режиме. При выполнении контрольного стадирования отмечалось отсутствие новых образований (как кожных, так и мягких тканей), наличие единичной паховой лимфаденопатии (паховый лимфатический узел справа размером  $28 \times 7$  мм с нормальным воротным кровотоком).

В результате консервативной поэтапной хирургической тактики за 1,5 мес получено полное заживление раны без рубцовых изменений и дефектов жевательных и мимических мышц (рис. 6).

### Заключение

Периферическая Т-клеточная лимфома неспецифицированная помимо нодальных локализаций нередко поражает экстранодальные области, в том числе кожу и мягкие ткани. Лечение такой лимфомы у пожилых пациентов, несмотря на неинтенсивные курсы индукционной терапии, сопряжено с высоким риском осложнений. При отсутствии химиочувствительности опухоли и развитии рефрактерности для пациентов старшей возрастной группы предпочтительно использовать иммунохимиотерапию. В данном клиническом случае таргетная терапия монокло-



**Рис. 6.** Внешний вид раны после 1,5 мес консервативной поэтапной хирургической тактики: минимальный дефект без грубых рубцовых изменений, отсутствует дефицит движений жевательной и мимической мускулатуры

**Fig. 6.** Wound appearance after 1.5 months of the conservative stepwise surgical management: a minimal defect without rough cicatricial changes, no dysfunction of masticatory and mimical muscles

нальным анти-CD30 антителом позволила достичь полной ремиссии Т-клеточной лимфомы, резистентной к предыдущим курсам ХТ. Лечение не сопровождалось токсическими осложнениями, что позволило проводить его в амбулаторных условиях с сохранением хорошего качества жизни.

Немаловажной особенностью клинической ситуации явилось то, что увеличение размеров опухолевидного образования создало иллюзию прогрессии опухоли, в то время как процесс ретроспективно расценен как распад опухоли и инфекция мягких тканей. Таким образом, прогрессирование заболевания всегда требует гистологической верификации.

Выбранная консервативная хирургическая тактика по ведению обширного раневого дефекта после вскрытия гнойно-некротического процесса привела к постепенному заживлению без рубцовых изменений и дефицита движений жевательной и мимической мускулатуры.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ellin F, Landström J., Jerkeman M. et al. Real-world data on prognostic factors and treatment in peripheral T-cell lymphomas: a study from the Swedish Lymphoma Registry. *Blood*. 2014;124(10):1570–7. DOI: 10.1182/blood-2014-04-573089.
2. De Leval L., Parrens M., Le Bras F. et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is the most common T-cell lymphoma in two distinct French information data sets. *Haematologica* 2015;100(9):e361–4. DOI: 10.3324/haematol.2015.126300.
3. Swerdlow S.H., Campo E., Pileri S.A. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127(20):2375–90. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569.
4. Weisenburger D.D., Savage K.J., Harris N.L. et al. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood* 2011;117(12):3402–8. DOI: 10.1182/blood-2010-09-310342.
5. Federico M., Rudiger T., Bellei M. et al. Clinicopathologic characteristics

- of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: analysis of the international peripheral T-cell lymphoma project. *J Clin Oncol* 2013;31(2):240–6.  
DOI: 10.1200/JCO.2011.37.3647.
6. Mourad N., Mounier N., Brière J. et al. Clinical, biologic and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood* 2008;111(9):4463–70.  
DOI: 10.1182/blood-2007-08-105759.
  7. Yamashita Y., Nakamura S., Kagami Y. et al. Lennert's lymphoma: a variant of cytotoxic T-cell lymphoma? *Am J Surg Pathol* 2000;24(12):1627–33.  
PMID: 11117783.
  8. Bossard C., Dobay M.P., Parrens M. et al. Immunohistochemistry as a valuable tool to assess CD30 expression in peripheral T-cell lymphomas: high correlation with mRNA levels. *Blood* 2014;124(19):2983–6.  
DOI: 10.1182/blood-2014-07-584953.
  9. De Leval L., Bisig B., Thielen C. et al. Molecular classification of T-cell lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;72(2):125–43.  
DOI: 10.1016/j.critrevonc.2009.01.002.
  10. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. Под ред. И.В. Поддубной, В.Г. Савченко. М.: Буки Веди, 2016. С. 85–91. [Russian Clinical Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Lymphoproliferative Diseases. Eds.: Poddubnaya I.V., Savchenko V.G. Moscow: Buki Vedi, 2016. P. 85–91. (In Russ)].
  11. Zinzani P.L., Venturini F., Stefoni V. et al. Gemcitabine as single agent in pretreated T-cell lymphoma patients: evaluation of the long-term outcome. *Ann Oncol* 2010;21(4):860–3.  
DOI: 10.1093/annonc/mdp508
  12. Arkenau H.T., Chong G., Cunningham D. et al. Gemcitabine, cisplatin and methylprednisolone for the treatment of patients with peripheral T-cell lymphoma: the Royal Marsden Hospital experience. *Haematologica* 2007;92(2):271–2.  
PMID: 17296587.
  13. Park B.B., Kim W.S., Suh C. et al. Salvage chemotherapy of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin (GDP) for patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphomas: a consortium for improving survival of lymphoma (CISL) trial. *Ann Hematol* 2015;94(11):1845–51.  
DOI: 10.1007/s00277-015-2468-y.
  14. Schmitz N., Trümper L., Ziepert M. et al. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood* 2010;116(18):3418–25.  
DOI: 10.1182/blood-2010-02-270785.
  15. Vose J., Armitage J., Weisenburger D. et al. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4124–30.  
DOI: 10.1200/JCO.2008.16.4558
  16. Escalón M.P., Liu N.S., Yang Y. et al. Prognostic factors and treatment of patients with T-cell non-Hodgkin lymphoma: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer* 2005;103(10):2091–8.  
DOI: 10.1002/cncr.20999.
  17. Kim J.G., Sohn S.K., Chae Y.S. et al. CHOP plus etoposide and gemcitabine (CHOP-EG) as front-line chemotherapy for patients with peripheral T cell lymphomas. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58(1):35–9.  
DOI: 10.1007/s00280-005-0136-y.
  18. Phase I Dose Finding Study of Belinostat for Treatment of Patients With Peripheral T-cell Lymphoma (PTCL). In: *ClinicalTrials.gov*. [Internet]. [Cited 2017, March 31]. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01839097>.
  19. Romidepsin in Combination With CHOEP as First Line Treatment Before Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Young Patients With Nodal Peripheral T-cell Lymphomas: a Phase I-II Study. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. [Cited 2017, March 31]. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02223208>.
  20. Mahadevan D., Unger J.M., Spier C.M. et al. Phase 2 trial of combined cisplatin, etoposide, gemcitabine, and methylprednisolone (PEGS) in peripheral T-cell non-Hodgkin lymphoma: Southwest Oncology Group Study S0350. *Cancer* 2013;119(2):371–9.  
DOI: 10.1002/cncr.27733.
  21. Trumper L.H., Wulf G., Ziepert M. et al. Alemtuzumab added to CHOP for treatment of peripheral T-cell lymphoma of the elderly: final results of 116 patients treated in the international ACT-2 phase III trial. *J Clin Oncol* 2016;34:7500.
  22. Anderson M.D. Cancer Center. Safety and Efficacy of Brentuximab Vedotin Maintenance After Allogeneic Stem Cell Transplantation in High Risk CD30+ Lymphoma (Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL)). In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. [Cited 2017, March 31]. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02169505>.
  23. A Multi-center, Randomized, Phase 3 Study of Sequential Pralatrexate Versus Observation in Patients With Previously Undiagnosed Peripheral T-cell Lymphoma Who Have Achieved an Objective Response Following Initial Treatment With CHOP-based Chemotherapy. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. [Cited 2017, March 31]. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01420679>.
  24. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 3 Study of Brentuximab Vedotin and CHP (A+CHP) Versus CHOP in the Frontline Treatment of Patients With CD30-positive Mature T-cell Lymphomas. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. [Cited 2017, March 31]. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01777152>.
  25. Horwitz S.M., Advani R.H., Bartlett N.L. et al. Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin. *Blood* 2014;123(20):3095–100.  
DOI: 10.1182/blood-2013-12-542142.
  26. A Randomized Phase 2 Trial of Brentuximab Vedotin (SGN35, NSC#749710), or Crizotinib (NSC#749005, Commercially Labeled) in Combination With Chemotherapy for Newly Diagnosed Patients With Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL). In: *ClinicalTrials.gov*. [Internet]. [Cited 2017, March 31]. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01979536>.
  27. Jo J.C., Choi Y., Shin H.J. et al. Peripheral T-cell lymphomas in elderly patients: a retrospective analysis from the Hematology Association of South East Korea (HASEK). *Ann Hematol* 2016;95(4):619–24.  
DOI: 10.1007/s00277-016-2597-y.
  28. Niitsu N., Kohori M., Higashihara M. et al. Phase II study of the irinotecan (CPT-11), mitoxantrone and dexamethasone regimen in elderly patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Sci* 2007;98(1):109–12.  
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00349.x.

## Факторы риска развития тромботических и геморрагических осложнений при эссенциальной тромбоцитемии

А.А. Жернякова, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев, Л.Б. Полушкина, М.С. Фоминых, В.Ю. Удальева, И.И. Зотова, Д.И. Шихбабаева, С.В. Волошин, С.С. Бессмельцев, А.В. Четкин, **К.М. Абдулкадыров**

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России;  
Россия, 191024 Санкт-Петербург, 2-я Советская ул., 16

Контакты: Анастасия Андреевна Жернякова [zhernyakova.a@mail.ru](mailto:zhernyakova.a@mail.ru)

**Введение.** Молекулярно-генетический фенотип (носительство одной из мутаций JAK2V617F (JAK2+), MPL (MPL+), CALR (CALR1+ – 1-й тип, CALR2+ – 2-й тип), его отсутствие – тройной-негативный (ТН) статус при эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) рассматриваются в качестве фактора, влияющего на развитие тромбозогеморрагических осложнений.

**Цель исследования** – оценить наличие и характер взаимосвязей между молекулярно-генетическими нарушениями, клинико-лабораторными параметрами и развитием осложнений, прогнозом течения ЭТ.

**Методы.** Проанализированы данные, полученные на этапе диагностики и последующего динамического наблюдения за 240 пациентами с ЭТ (критерии ВОЗ 2008 г.). Исследовались показатели гемограммы, результаты молекулярно-генетических методов: полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) для определения мутации JAK2V617F, полимеразной цепной реакции с последующим анализом ПДРФ (ПЦР-ПДРФ) для выявления мутаций MPL и прямого секвенирования для обнаружения CALR. Регистрировались тромботические и/или геморрагические осложнения: артериальные/венозные тромбозы, острый инфаркт миокарда (ОИМ), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) и кровотечения. Проведен анализ общей выживаемости (ОВ) у пациентов с наличием/отсутствием осложнений, различных групп риска развития тромботических осложнений по шкале риска тромбозов при ЭТ (ВОЗ-ЭТ IPSET-thrombosis).

**Результаты.** Среди 240 пациентов у 183 (76,3 %) наблюдалось состояние без осложнений (БО), у 57 (23,7 %) развились осложнения, из них у 49 (85,9 %) больных – артериальные/венозные тромбозы, ОНМК и ОИМ (тромбозы+), у 11 (19,3 %) – кровотечения (геморрагии+). Тромботические осложнения в JAK2+ были у 50/182 (27,4 %) больных, ТН – у 8/26 (30,7 %) пациентов, CALR1+ – у 2/11 (18,2 %). При CALR2+ и MPL+ тромбозов не отмечено ( $p < 0,001$ ). Выявлено наличие статистически значимых различий по уровню тромбоцитов между пациентами групп «тромбозы+» и «геморрагии+» ( $p = 0,003$ ), по уровню гемоглобина и лейкоцитов таковых отмечено не было ( $p = 0,75$  и  $p = 0,47$ ). Пациентов старше 60 лет было более половины в группах пациентов БО (51 %) и «тромбозы+» (59 %), а в группе «геморрагии+» – значительно меньше (36 %,  $p < 0,001$ ). По наличию сердечно-сосудистых факторов риска в анамнезе (БО – 24 %, «тромбозы+» – 69 % и «геморрагии+» – 36 %) подгруппы также значимо отличались ( $p < 0,001$ ). Различий по гипертромбоцитозу (более  $1000 \times 10^9/\text{л}$ ) и лейкоцитозу (более  $11 \times 10^9/\text{л}$ ) не получено ( $p = 0,85$  и  $p = 0,72$  соответственно). При анализе ОВ не выявлено статистически значимых различий между подгруппами с осложнениями и без них ( $p = 0,21$ ) и группами по шкале ВОЗ-ЭТ (IPSET-thrombosis) ( $p = 0,068$ ).

**Заключение.** Лейкоцитоз и гипертромбоцитоз не являются тромбогенными факторами. Мутация JAK2V617F ассоциирована с увеличением риска и частоты тромбозов, мутации CALR (вне зависимости от типа) не увеличивают риск и частоту тромбозов, но увеличивают частоту кровотечений.

**Ключевые слова:** эссенциальная тромбоцитемия, мутация гена янускиназы (JAK2), мутация в гене кальретикулина, ген, кодирующий рецептор к тромбопоэтину, тройной-негативный статус

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-30-38

### Thrombotic and bleeding risk factors in essential thrombocythemia

A. Zhernyakova, I. Martynkevich, V. Shuvaev, L. Polushkina, M. Fominykh, V. Udal'eva,  
I. Zotova, D. Shichbabaeva, S. Voloshin, S. Bessmeltcev, A. Chechetkin, **K. Abdulkadyrov**

Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology under the Federal Medico-Biological Agency,  
16 2-ya Sovetskaya Str., Saint Petersburg 191024, Russia

**Background.** Thrombosis and hemorrhage are the main category of complications, that affects the overall survival (OS), quality of life and therapy option choice in essential thrombocythemia (ET). Molecular marker presence (JAK2V617F (JAK2+), MPL (MPL+), CALR (CALR1+-type 1, CALR2+-type 2) or its absence (triple-negative status (TN)) in ET supposed to impact on the clinical course, thrombosis rate and ET prognosis.

**The aim of this study** was to investigate interactions between the presence of molecular marker, thrombosis/bleeding rates and the OS in ET. **Methods.** Outpatient's charts of 240 ET patients, who had been diagnosed with ET at our institution according to WHO 2008 criteria. The following data were assessed: complete blood count, bone marrow biopsy results, bone marrow cytogenetic, the restriction fragment length

polymorphism (RFLP) results used for *JAK2V617F* detection, in case of *JAK2V617F*-negative status the PCR-RFLP results (*MPL* detection) and the direct sequencing results (*CALR* detection). Different thrombotic/bleeding complications rates were analyzed. The OS in ET patients was compared according to complications and IPSET-thrombosis groups.

**Results.** Among 240 pts 183 (76.3 %) hadn't any thrombotic complication or bleeding event (no complications/NC), 57/240 (23.7 %) had complications: 49/57 (85.9 %) reported arterial or/and venous thrombosis, stroke or heart failure (thrombosis+) and 11/57 (19.3 %) had bleeding events (hemorrhage+). Thrombotic complications in *JAK2+* had 27.4 % (50/182) pts, in TN – 30.7 % (8/26) pts, in *CALR1+* – 18.2 % (2/11) pts and no cases of thrombosis were detected in *CALR2+* and *MPL+* subgroups ( $p < 0,001$ ). There were significant statistical differences in median platelet count as follows:  $742 \times 10^9/L$  (thrombosis+) and  $937 \times 10^9/L$  (hemorrhage+) ( $p = 0.003$ ). No significant statistical differences in median hemoglobin and leukocyte count ( $p = 0.75$  and  $p = 0.47$ ) were detected. There were more than a half pts older than 60 years in groups NC (51 %) and thrombosis+ (59 %) and in group hemorrhage+ only 36 % ( $p < 0,001$ ). Cardiovascular risk factors were reported in 24 % pts (NC), 69 % pts (thrombosis+) and 36 % pts (hemorrhage+) ( $p < 0,001$ ). There were no significant statistical differences in follows risk factors as platelets count  $> 1000 \times 10^9/L$  and leukocytosis  $> 11 \times 10^9/L$  ( $p = 0.85$  and  $p = 0.72$ ). No significant differences in OS among groups NC, thrombosis+ and hemorrhage+ ( $p = 0.21$ ) and IPSET-thrombosis groups ( $p = 0,068$ ) were found.

**Conclusion.** Along with common thrombotic risk factors (age  $> 60$  and cardiovascular risk factors) mutational status may help to identify ET course. Leukocytosis  $> 10 \times 10^9/L$  and thrombocytosis  $> 1000 \times 10^9/L$  cannot be assessed as independent thrombosis risk factors in ET. The *JAK2V617F* mutation was associated with increased risk of thrombotic complications in ET. *CALR* mutations were associated with lower thrombosis risk, comparing to *JAK2+* status despite the fact of *CALR+* patients had higher platelets level.

**Keywords:** essential thrombocythemia, Janus kinase gene mutation (*JAK2V617F*), calreticulin gene mutation, myeloproliferative leukemia virus oncogene, triple-negative status

## Введение

Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) – хроническое клональное миелопролиферативное новообразование с неконтролируемой пролиферацией мегакариоцитов, характеризующееся повышенным числом их крупных и гигантских форм в костном мозге, тромбоцитозом в периферической крови (более  $450 \times 10^9/L$ ) и клинически – эпизодами тромбозов и / или кровотечениями [1].

Как и все заболевания подгруппы классических Ph-негативных миелопролиферативных новообразований (МПН), которые включают наряду с ЭТ истинную полицитемию (ИП) и первичный миелофиброз (ПМФ), ЭТ развивается в результате злокачественной трансформации полипотентной клетки – предшественницы гемопоэза и сопровождается гиперактивацией клеточного сигнального JAK-STAT-пути (*JAK2* – ген янускиназы), что приводит к последующей неконтролируемой пролиферации клона морфологически и функционально измененных мегакариоцитов [2–4]. ЭТ рассматривают как прогностически наиболее благоприятное заболевание группы Ph-негативных МПН в связи с длительным отсутствием симптомов заболевания и сохранением общей продолжительности жизни пациентов на уровне, сравнимом с общепопуляционным [5, 6].

При ЭТ основной категорией нежелательных явлений, снижающих качество и продолжительность жизни пациентов, является развитие тромботических и геморрагических осложнений. Ведущими факторами, увеличивающими риск возникновения тромбозов у данной категории пациентов, длительное время признавались возраст старше 60 лет и наличие предшествующих тромбозов в анамнезе [2, 5, 7, 8].

С целью стратификации рисков тромботических осложнений при ЭТ в 2010 г. Британский комитет

стандартов в гематологии (British Committee for Standards in Haematology, BCSH) разработал систему оценки рисков тромбозов, включающую также в качестве одного из факторов гипертромбоцитоз (более  $1500 \times 10^9/L$ ) [7, 9]. Данная система не получила широкого применения в клинической практике, а вопрос о возможном влиянии гипертромбоцитоза на риск развития тромбозов при ЭТ остается дискуссионным.

Открытие и исследование роли соматической точечной мутации *JAK2V617F* в патогенезе ЭТ [10, 11], появление убедительных данных об увеличении риска и частоты тромботических осложнений у *JAK2V617F*-положительных пациентов [12] позволили экспертам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. модифицировать существовавшую шкалу оценки риска развития тромбозов при ЭТ – IPSET (International Prognostic Score Score for ET), разработанную в 2011 г. Данная шкала включала также в качестве независимого фактора риска тромбозов лейкоцитоз более  $11 \times 10^9/L$  [7, 13]. В новый модифицированный вариант шкалы IPSET – WHO-ET IPSET-thrombosis [7, 14] впервые включили носительство мутации *JAK2V617F* в качестве независимого тромбогенного фактора (табл. 1).

Шкала IPSET-thrombosis в настоящее время является универсальным инструментом для оценки рисков тромботических осложнений у пациентов с ЭТ и широко используется в практической деятельности при определении тактики терапии пациентов.

На современном этапе известны уже 3 соматические драйверные мутации при ЭТ: *JAK2V617F*, *MPL* (ген, кодирующий рецептор к тромбопоэтину) и *CALR* (кальретикулин) генов, участвующих в активации JAK-STAT-пути [15–18]. Кроме того, около 10 % пациентов с ЭТ относятся к категории пациентов с TN-статусом, у которых не определяются мутации

Таблица 1. Международная прогностическая шкала риска развития тромбозов ВОЗ-ЭТ (IPSET-thrombosis) [14]

Table 1. International thrombosis prognostic risk scale WHO-ET

Критерии Criteria	Балл по шкале* Score on the scale*
Возраст старше 60 лет Age over 60 years	1
Сердечно-сосудистые факторы риска (сахарный диабет, курение, артериальная гипертензия) Cardiovascular risk factors (diabetes mellitus, smoking, hypertension)	1
Тромбозы в анамнезе History of thrombosis	2
JAK2V617F	2

\* Риски: низкий — 0–1 балл, промежуточный — 2 балла, высокий — 3 и более баллов.

\* Risks: low — 0–1 points, intermediate — 2 points, high — 3 points or more.

ни в одном из 3 генов. Однако при ЭТ достоверно установлен только тромбогенный потенциал мутации *JAK2V617F*, тогда как однозначного представления о влиянии других патогенетических мутаций или ТН-статуса на возникновение тромбозов не сформировано [19–21]. В настоящее время представляется актуальным вопросом целесообразность включения других драйверных мутаций в прогностическую шкалу рисков тромботических осложнений при ЭТ.

**Целью** нашего исследования является оценка возможного влияния наличия различных генетических нарушений и клинико-лабораторных параметров на развитие тромбгеморрагических осложнений при ЭТ и прогноз течения заболевания.

#### Пациенты и методы

Проанализированы данные, полученные на этапе диагностики и последующего динамического наблюдения за 240 пациентами с ЭТ. Медиана наблюдения составила 37,2 мес (период наблюдения 3–192 мес). Включение больных в исследование проводилось в соответствии с диагностическими критериям ВОЗ 2008 г. (WHO'2008) [22–24].

На этапе диагностики выполнялись следующие исследования: клинический анализ крови с визуальным подсчетом тромбоцитов, цитогенетическое и гистологическое исследования костного мозга с оценкой наличия и степени выраженности фиброза согласно шкале Европейского консенсуса патоморфологов по оценке клеточности и фиброза костного мозга [25]. У всех пациентов проводили определение *JAK2V617F*-статуса методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). При отрицательном результате исследовали мутации в 515-м кодоне гена *MPL* с помощью полимеразной цепной реакции с последующим анализом ПДРФ (ПЦР-ПДРФ) и мутации в 9-м экзоне гена *CALR* методом прямого секвенирования.

При верификации диагноза и в течение периода динамического наблюдения проводилась регистрация тромботических и геморрагических осложнений:

артериальных и венозных тромбозов, острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), острого инфаркта миокарда (ОИМ), эпизодов кровотечений различной локализации. Стратификация рисков развития тромбозов осуществлялась согласно шкале IPSET-thrombosis. В проводимом анализе учитывались дополнительные факторы, которые могут влиять на риск развития тромботических осложнений при ЭТ: гипертромбоцитоз (более  $1000 \times 10^9/\text{л}$ ) и лейкоцитоз (более  $11 \times 10^9/\text{л}$ ). Дата верификации диагноза ЭТ служила точкой отсчета при проведении анализа общей выживаемости (ОВ) пациентов.

Обработка данных и статистический анализ проводились с использованием программ Microsoft Excel 2013 и StatSoft Statistica 10. Статистическая значимость различий оценивалась с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) Краскела–Уоллиса, критерия  $\chi$ -квадрат с поправкой Йетса, U-теста Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне  $p < 0,05$ . ОВ оценивалась посредством построения кривых Каплана–Майера, разницу определяли с помощью логарифмического рангового теста.

#### Результаты

В группе из 240 больных ЭТ были 62 (25,8 %) мужчины и 178 женщин (74,2 %) от 20 лет до 91 года (медиана возраста — 58,7 года). Мутационный статус обследованных пациентов имел следующее распределение: у 182 (75,9 %) выявлена *JAK2V617F* (*JAK2+*); у 30 (12,5 %) — *CALR*-мутации (*CALR+*) 1-го и 2-го типов: у 13 (43,3 %) из них *CALR1+* и у 17 (56,7 %) — *CALR2+*. Также у 2 (0,8 %) пациентов обнаружены *MPL*-мутации (*MPL+*), у 26 (10,8 %) — ТН-статус.

По результатам цитогенетического анализа образцов костного мозга, проведенного у 47 (19,6 %) обследованных больных, лишь у 1 (2,1 %) *JAK2+*-пациентки были выявлены комплексные изменения кариотипа (остальные имели нормальный кариотип). Следует отметить, что на этапе первичной диагностики у данной

пациентки кариотип также был нормальным, а клональная хромосомная эволюция наблюдалась при трансформации заболевания в фазу бластного криза (БК).

При гистологическом исследовании костного мозга у 76 (31,7 %) пациентов отмечена гиперклеточность и наличие атипичных мегакариоцитов и у 9 (11,8 %) из них – признаки, соответствующие I степени фиброза по шкале Европейского консенсуса патоморфологов [25].

Из всех обследованных пациентов тромбогеморрагические осложнения не были отмечены у 183 (76,3 %), тогда как у 57 (23,7 %) они присутствовали: в том числе эпизоды артериальных и/или венозных тромбозов, ОНМК и/или ОИМ (тромбозы+) – в 49 (85,9 %) случаях; геморрагические проявления (геморрагии+) – в 11 (19,3 %). Кроме того, отмечены тромбозы в сочетании с эпизодами кровотечений у 3 пациентов из 57. В группе «тромбозы+» у 21 (42,9 %) из 49 пациентов были выявлены артериальные тромбозы, при этом у каждого пациента данной подгруппы в сочетании с иным видом осложнения – венозным тромбозом, ОИМ или ОНМК, а у 3 – с эпизодами кровоточивости. Из 49 пациентов этой группы у 12 (24,5 %) отмечались венозные тромбозы, у 27 (55,1 %) – ОИМ и/или ОНМК, у последних в 16 (59,3 %) случаях ОИМ/ОНМК сочетался с периферическими тромбозами. Абсолютное большинство пациентов отмечали появление указанных осложнений до верификации диагноза ЭТ, за исключением 2 *JAK2*+ пациентов: у 1 был повторный ОИМ после верификации ЭТ, у 2-го – ОНМК (в анамнезе имелся венозный тромбоз).

При сравнении частоты тромбогеморрагических осложнений у пациентов с различным мутационным статусом было отмечено, что артериальные тромбозы встречались у 9,3 % *JAK2*+ пациентов, венозные – у 5,5 %, ОНМК + ОИМ – у 12,6 % и геморрагические осложнения – у 3,8 %. У *CALR*+ пациентов: артериальные тромбозы зарегистрированы у 7,6 % больных, венозные же отмечены не были, ОНМК+ОИМ встречался у 7,7 % и геморрагические осложнения – у 21,3 %. В подгруппе пациентов с ТН-статусом артериальные тромбозы выявлены в 11,5 % случаев, венозные – в 7,7 %, ОНМК+ОИМ – в 11,5 % и геморрагические осложнения – в 3,8 %. Распределение пациентов с тромбозами и геморрагиями по мутационному статусу представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

При анализе показателей клинического анализа крови, взятого на этапе верификации диагноза пациентов в подгруппах с различными осложнениями (табл. 2), было выявлено наличие статистически значимых различий по количеству тромбоцитов между пациентами подгрупп «тромбозы+» и «геморрагии+»:  $742 \times 10^9/\text{л}$  и  $937 \times 10^9/\text{л}$  соответственно ( $p = 0,003$ ). Обращает на себя внимание то, что у *CALR*+ пациентов (вне зависимости от типа мутации) зарегистрированы значимо более высокие показатели уровня тромбоцитов на этапе диагностики в сравнении с пациентами *JAK2*+ и с ТН-статусом ( $p < 0,001$ ), по другим показателям клинического анализа крови выявлены различия только по уровню гемоглобина ( $p = 0,005$ ).

На следующем этапе было проанализировано наличие как основных (возраст старше 60 лет, сердечно-

Таблица 2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с наличием осложнений и без них

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of patients with and without complications

Исследуемый показатель Criteria	Без осложнений, $n = 193$ Without complications, $n = 193$	Тромбозы+, $n = 49$ Thrombosis+, $n = 49$	Геморрагии+, $n = 11$ Hemorrhage+, $n = 11$
Медиана возраста (диапазон), лет Median age (range), years	57 (20–91)	62 (23–91)	58 (29–77)
Число пациентов, мужчины/женщины Number of patient, men/women	44/149	14/35	5/6
Гемоглобин, г/л: Hemoglobin, g/L: мужчины/женщины men/women то же в среднем (диапазон) mean (range)	150/137 (113–178)/(88–175)	146/140 (110–180)/109–173)	146/140 (123–159)/(130–152)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Leukocytes, $\times 10^9/\text{L}$ в среднем (диапазон) mean (range)	10,0 (3,7–25,4)	9,4 (5,0–18,6)	8,6 (5,0–12,0)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{L}$ в среднем (диапазон) mean (range)	894 (313–2079)	742 (313–1492)	937 (554–2500)

Таблица 3. Наличие факторов риска развития тромбозов у пациентов с осложнениями и без них при эссенциальной тромбоцитемии

Table 3. The presence of thrombosis risk factors in ET patients with and without complications

Исследуемый показатель Criteria	Без осложнений, n = 193 Without complications, n = 193	Тромбозы+, n = 49 Thrombosis+, n = 49	Геморрагии+, n = 11 Hemorrhage+, n = 11
Возраст старше 60 лет, n (%) Age over 60 years, n (%)	93 (51)	29 (59)	4 (36)
Наличие как минимум одного сердечно-сосудистого фактора риска, n (%) Presence of at least one cardiovascular risk factor, n (%)	47 (24)	34 (69)	14 (36)
Лейкоциты >11×10 <sup>9</sup> /л, n (%) Leukocytes >11×10 <sup>9</sup> /L, n (%)	51 (28)	13 (27)	3 (27)
Тромбоциты >1000 × 10 <sup>9</sup> /л, n (%) Platelets >1000×10 <sup>9</sup> /L, n (%)	47 (26)	7 (14)	2 (18)

сосудистые факторы риска в анамнезе), так и дополнительных (гипертромбоцитоз и лейкоцитоз) факторов риска развития тромботических осложнений (табл. 3). По этим факторам пациенты старше 60 лет составили более половины (51 и 59 %) в группах без осложнений (БО) и «тромбозы+» соответственно, тогда как в группе «геморрагии+» – лишь 36 % ( $p < 0,001$ ). По наличию сердечно-сосудистых факторов риска в анамнезе (БО – 24 %, тромбозы+ – 69 % и геморрагии+ – 36 %) подгруппы также значительно различались ( $p < 0,001$ ). В анализируемых подгруппах статистически значимых различий по гипертромбоцитозу (>1000 × 10<sup>9</sup>/л) и лейкоцитозу (>11 × 10<sup>9</sup>/л) не получено ( $p = 0,85$  и  $0,72$  соответственно). По зарегистрированным факторам риска все пациенты были отнесены к соответствующим группам риска тромбозов (табл. 4), включенным в шкалу IPSET-thrombosis. При распределении пациентов анализируемых подгрупп по сумме баллов согласно шкале IPSET-thrombosis отмечены статистически значимые различия: в подгруппе БО распределение пациентов по группам риска в целом равномерное, тогда как в подгруппе «тромбозы+» подавляющее большинство (93,9 %) имело высокий риск развития тромбозов. В подгруппе «геморрагии+» более половины

(54,5 %) пациентов достигли уровня высокого и 36,4 % – промежуточного риска ( $p < 0,001$ ).

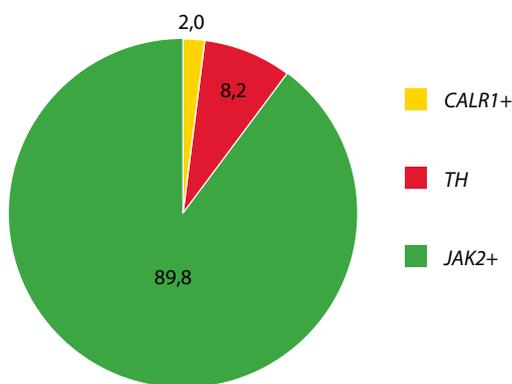
При анализе динамики ОБ пациентов различных групп риска развития тромбозов по шкале IPSET-thrombosis (кривые Каплана–Майера, рис. 3) статистически значимые различия между группами также не были выявлены ( $p = 0,068$ ), при этом отмечено следующее:

- при низком риске развития тромбозов прогноз можно охарактеризовать как наиболее благоприятный: обращает на себя внимание отсутствие снижения уровня ОБ в течение всего периода наблюдения – 5- и 10-летняя выживаемость в данной группе составила 98 %;
- группу промежуточного риска также следует рассматривать в целом как прогностически благоприятную: 5-летняя ОБ составила 97 %, а 10-летняя – 91 %;
- группа высокого риска возникновения тромбозов характеризуется наименее благоприятным прогнозом: 5-летняя ОБ – 90 %, а 10-летняя – только 61 %;
- медиана ОБ не была достигнута ни в одной из подгрупп.

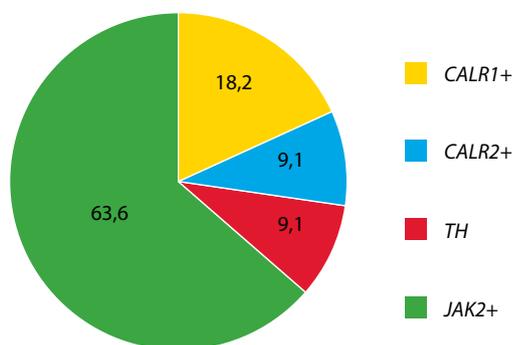
Таблица 4. Распределение пациентов с наличием и без осложнений согласно группам риска шкалы IPSET-thrombosis

Table 4. Distribution of patients with and without complications according to IPSET-thrombosis scale risk groups

Группа шкалы IPSET-thrombosis IPSET-thrombosis scale group	Без осложнений, n = 193 Without complications, n = 193	Тромбозы+, n = 49 Thrombosis+, n = 49	Геморрагии+, n = 11 Hemorrhage+, n = 11
Группы риска, n (%): Risk groups, n (%):			
низкого low	44/193 (22,8)	0/49 (0)	1/11 (9,1)
промежуточного intermediate	66/193 (34,2)	3/49 (6,1)	4/11 (36,4)
высокого high	83/193 (43,0)	46/49 (93,9)	6/11 (54,5)



**Рис. 1.** Мутационный статус пациентов с тромбозами ( $n = 49$ ), %. CALR1+ – 1-й тип мутации гена кальретикулина, JAK2+ – мутация гена янускиназы, TH – тройной-негативный статус  
**Fig. 1.** Mutational status in patients with thrombosis,  $n = 49$ , %. CALR1+ – calreticulin type 1, JAK2+ – januskinase 2, TH – triple-negative status



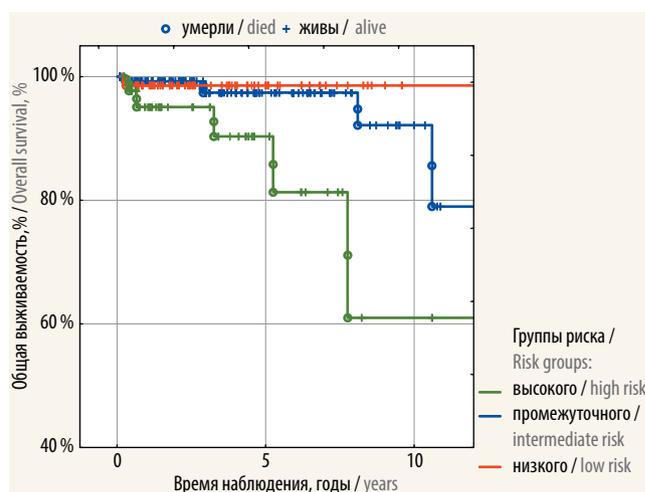
**Рис. 2.** Мутационный статус у пациентов с геморрагическими осложнениями ( $n = 11$ ), %. CALR1+ и CALR2+ – CALR-мутации 1-го и 2-го типов кальретикулина, JAK2+ – мутация гена янускиназы, TH – тройной-негативный статус  
**Fig. 2.** Mutational status in patients with hemorrhagic complications ( $n = 11$ ), %. CALR1+ и CALR2+ – calreticulin mutation type 1 and type 2, JAK2+ – januskinase 2, TH – triple-negative status

При сравнении ОВ в группах БО, «тромбозы+» и «геморрагии+» (кривые Каплана–Майера, рис. 4) статистически значимых различий не выявлено ( $p = 0,21$ ):

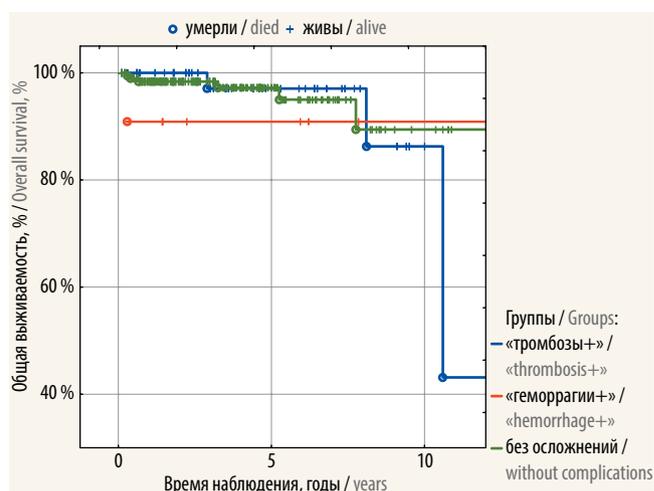
- 5-летняя ОВ составила соответственно в подгруппах БО и «тромбозы+» – 97 %, в «геморрагии+» – 90 %;
- 10-летняя ОВ сохранилась на прежнем уровне в подгруппе «геморрагии+» (90 %) и снизилась до 88 и 86 % в подгруппах БО и «тромбозы+» соответственно;
- медиана ОВ была достигнута только в подгруппе «тромбозы+» и составила 12 лет.

Возможными неблагоприятными исходами ЭТ являются трансформация во вторичный миелофиброз (МФ), переход в фазу БК или летальный исход (табл. 5).

Среди пациентов исследуемых подгрупп статистически достоверных различий по трансформации ЭТ в МФ или БК не получено ( $p = 0,07$  и  $p = 0,79$  соответственно). Однако у пациентов подгруппы «геморра-



**Рис. 3.** Общая выживаемость пациентов различных групп риска по шкале IPSET-thrombosis,  $p = 0,068$   
**Fig. 3.** OS in pts in different IPSET-thrombosis groups,  $p = 0,068$



**Рис. 4.** Общая выживаемость пациентов с наличием или без осложнений,  $p = 0,21$   
**Fig. 4.** Overall survival in pts with or without complications,  $p = 0,21$

гии+» отмечен только один случай трансформации ЭТ в МФ и ни одного перехода заболевания в фазу БК, тогда как в подгруппах «тромбозы+» и БО такие исходы регистрировались чаще.

### Обсуждение

ЭТ характеризуется неконтролируемым повышением пролиферации клональных клеток-предшественников миелоидного ряда, сопровождающимся изолированным тромбоцитозом/гипертромбоцитозом и/или лейкоцитозом в периферической крови. Основными жизнеугрожающими осложнениями заболевания являются тромбозы различной локализации. Среди общепризнанных тромбогенных факторов при ЭТ – возраст старше 60 лет, наличие в анамнезе тромбозов и сердечно-сосудистых факторов риска (артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение и гиперлипидемия) [5, 26, 27].

Таблица 5. Неблагоприятные исходы у пациентов с тромбозогеморрагическими осложнениями и без осложнений

Table 5. Adverse outcomes in patients with and without complications

Исследуемый показатель Criteria	Без осложнений, n = 193 Without complications, n = 193	Тромбозы+, n = 49 Thrombosis+, n = 49	Геморрагии+, n = 11 Hemorrhage+, n = 11
Трансформация в миелофиброз, n (%) MF transformation, n (%)	4/193 (2,1)	4/49 (8,2)	1/11 (9,1)
Трансформация в бластный криз, n (%) BC transformation, n (%)	2/193 (1,0)	1/49 (2,0)	0/0 (0)
Летальный исход, n (%) Death, n (%)	7/193 (3,6)	3/49 (6,1)	1/11 (9,1)

На современном этапе риск развития тромбозов при ЭТ оценивается с помощью универсального инструмента – шкалы IPSET-thrombosis. Однако появление новых данных о молекулярно-генетической природе данной патологии и результаты многоцентровых исследований по изучению особенностей течения ЭТ у пациентов с различным молекулярно-генетическим статусом актуализируют вопрос о целесообразности включения носительства той или иной патогенетической мутации в прогностическую шкалу оценки рисков развития тромбозов при ЭТ. В частности, А. Tefferi и Т. Barbui [28] предлагают стратифицировать пациентов не на 3, а на 4 группы риска тромбозов:

- 1) с очень низким риском (пациенты моложе 60 лет, без тромбозов в анамнезе, *JAK2V617F/MPL*-отрицательные);
- 2) с низким риском (моложе 60 лет, без тромбозов в анамнезе, *JAK2V617F/MPL*-положительные);
- 3) с промежуточным риском (старше 60 лет, с тромбозами в анамнезе, *JAK2V617F/MPL*-отрицательные);
- 4) с высоким риском тромбозов (старше 60 лет или с тромбозами в анамнезе, *JAK2V617F/MPL*-положительные).

В настоящее время не вызывает сомнений доказанный в ходе исследований независимый тромбогенный потенциал мутации *JAK2V617F* [29]. Следует обратить внимание, что перестройки в гене *MPL* также рассматриваются в качестве прогностически неблагоприятного фактора, и это нашло отражение в предложенной А. Tefferi и Т. Barbui градации пациентов по группам риска тромботических осложнений [28].

Однозначного представления о тромбогенном потенциале перестроек гена *CALR* в настоящее время не сформировано. В своем исследовании G. Finazzi и соавт. [30] продемонстрировали отсутствие достоверного влияния мутаций гена *CALR* на расчет рисков развития тромбозов с применением шкалы IPSET-thrombosis, что свидетельствует об отсутствии необходимости рассматривать носительство данной мутации в качестве одного из возможных факторов для включения в эту шкалу.

В проведенном нами исследовании было отмечено, что частота и количество зарегистрированных тромбозов при носительстве *CALR*-мутаций в 2 раза ниже в сравнении с подгруппой *JAK2+*-пациентов. В своих работах J. Nangalia и соавт. [16], E. Rumi и соавт. [21] также отмечали такую характерную взаимосвязь – достоверное потенцирование тромбозов при *JAK2+*-статусе и нарастание частоты геморрагических осложнений при носительстве *CALR*-мутаций. При этом достоверных различий в развитии тромбозов между носителями 1-го и 2-го типа мутаций не выявлено, несмотря на в целом менее благоприятное течение заболевания при носительстве 2-го типа *CALR*-мутации [20, 31, 32].

Наличие мутации *JAK2V617F* является независимым фактором, увеличивающим риск возникновения тромботических осложнений. По результатам проведенного исследования у пациентов-носителей *JAK2V617F*-мутации достоверно чаще регистрировались тромботические осложнения в сравнении с *CALR+*-пациентами (21,9 против 11,0 % – 1-й тип и 6,7 % – 2-й тип).

Значимых различий между пациентами *MPL+* и с ТН-статусом при оценке рисков и частоты развития тромбозов и возможном влиянии данных молекулярно-генетических фенотипов на развитие тромбозов не получено. Увеличение или снижение рисков и частоты развития тромбозов у пациентов данных подгрупп исследовано в недостаточной степени и требует дальнейшего изучения.

В качестве независимого фактора, увеличивающего риск развития тромбозов при ЭТ, в ряде исследований (F. Passamonti и соавт. [13], P.J. Campbell и соавт. [33], A. Carrobbio и соавт. [30, 34], G. Finazzi и соавт. [29]) рассматривается и наличие лейкоцитоза (более  $11 \times 10^9/\text{л}$ ). В проведенном нами исследовании достоверной взаимосвязи между наличием лейкоцитоза и нарастанием риска и частоты тромбоза не отмечено ( $p > 0,05$ ).

Гипертромбоцитоз (более  $1000 \times 10^9/\text{л}$ ) также приводится в ряде публикаций в качестве фактора, не влияющего на возникновение тромбозов [7, 13, 33], тогда как в других [26, 28] его рассматривают вне зависимости от мутационного статуса как фактор, способству-

ющий увеличению частоты спонтанных кровотечений за счет повышенной сорбции плазменного фактора Виллебранда на поверхности тромбоцитов с развитием одноименного синдрома при ЭТ. У пациентов-носителей мутаций гена *CALR*, достоверно чаще ассоциированной с гипертромбоцитозом, по данным E. Rumi и соавт. [21], частота развития геморрагических осложнений возрастает. По результатам проведенного исследования отмечено, что при носительстве *CALR*-мутаций частота зарегистрированных геморрагий составила 23,9 %, тогда как при мутации *JAK2V617F* только 3,6 %, при ТН-статусе геморрагии не зарегистрированы. Кроме того, обращает на себя внимание наличие более высокого уровня тромбоцитов у пациентов с геморрагическими осложнениями по сравнению с показателями пациентов с тромбозами. Таким образом, достоверного влияния лейкоцитоза и тромбоцитоза на риск развития тромбозов при ЭТ, по результатам проведенного анализа, не зарегистрировано.

### Заключение

Возникновение тромботических осложнений является критерием неблагоприятного развития

ЭТ и может рассматриваться в качестве фактора негативного прогноза заболевания. Наряду с ведущими факторами, увеличивающими риск развития тромбозов (возраст старше 60 лет и сердечно-сосудистые факторы риска в анамнезе) мутационный статус может оказывать влияние на особенности течения ЭТ. Так, носительство мутации *JAK2V617F* ассоциировано с достоверным возрастанием риска и частоты развития тромбозов. Наличие мутаций в гене *CALR*, несмотря на связанный с ее носительством более высокий уровень тромбоцитов при верификации ЭТ, не характеризуется увеличением риска и частоты развития тромбозов, но ассоциировано с увеличением частоты геморрагических осложнений за счет развития синдрома Виллебранда.

В большинстве случаев изучение влияния мутаций в гене *MPL* осложняется небольшой частотой встречаемости мутации при ЭТ. Пациенты с ТН-статусом — наименее изученная подгруппа.

Лейкоцитоз и гипертромбоцитоз не могут рассматриваться в качестве независимых тромбогенных факторов риска.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Источники финансирования:** исследование выполнено в рамках НИР «Хронические миелолипролиферативные новообразования-15».

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Меликян А.Л., Туркина А.Г., Абдулкадыров К.М. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелолипролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз). II Конгресс гематологов (апрель 2014 г.). М., 2014. [Melikyan A.L., Turkina A.G., Abdulkadyrov K.M. et al. Clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative diseases (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis). II Congress of Hematology (April 2014). Moscow, 2014. (In Russ.)]. <http://blood.ru/documents/clinical%20guidelines/28.%20klinicheskie-rekomendacii-2014-xmpz-ph-neg.pdf>
2. Гематология: Национальное руководство / Под ред. О.А. Рукавицына. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. [Hematology: National Guidelines. Ed.: Rukavitsin O.A. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. (In Russ.)].
3. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544. PMID: 27069254.
4. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Современные подходы к диагностике и лечению эссенциальной тромбоцитемии: обзор литературы и собственные данные. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2015;8(3):235–47. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S. Modern Approaches to essential thrombocythemia diagnosis and treatment: literature review and own experience. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2015;8(3):235–47 (In Russ.)].
5. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Миелолипролиферативные новообразования. М.: Литтерра, 2016. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S. Myeloproliferative neoplasms. Moscow: Litterra, 2016 (In Russ.)].
6. Petrides P. CMPE 2014. Aktuelle empfehlungen zu diagnostik und therapie chronisch myeloproliferativer erkrankungen 4. Aufgabe. München, 2014. 48 S.
7. Dambrauskienė R., Gerbutavicius R., Juozaityte E., Gerbutaviciene R. Thrombotic risk assessment in 185 WHO-defined essential thrombocythemia patients: single centre experience. *Contemp Oncol* 2015;19(5):396–9. DOI: 10.5114/wo.2015.54083. PMID: 26793025.
8. Tefferi A., Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2015;90(2):162–73. DOI: 10.1002/ajh.23895. PMID: 25611051.
9. Rumi E., Gazzola M. How I treat essential thrombocythemia. *Blood* 2016;128(20):2403–14. DOI: 10.1182/blood-2016-05-643346. PMID: 27561316.
10. Wolanskyj A., Lasho T.L., Schwager S.M. et al. JAK2 mutation in essential

- thrombocytopenia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005;131(2):208–13. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05764.x. PMID: 16197451.
11. Baxter E., Scott L.M., Campbell P.J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365(9464):1054–61. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71142-9/ PMID: 15781101.
  12. Cheung B., Radia D., Pantelidis P. et al. The presence of the JAK2V617F mutation is associated with higher hemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2006;132(2):244–50. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05858.x. PMID: 16398659.
  13. Passamonti F., Thiele J., Girodon F. et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocytopenia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2012;120(6):1197–201. DOI: 10.1182/blood-2012-01-403279. PMID: 22740446.
  14. Barbui T., Finazzi G., Carobbio A. et al. Development and Validation of an International Prognostic Score of Thrombosis in World Health Organization-essential thrombocytopenia (IPSET-thrombosis). *Blood* 2012;120(26):5128–33. DOI: 10.1182/blood-2012-07-444067. PMID: 23033268.
  15. Andrikovics H., Krahling T., Balassa K. et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica* 2014;99(7):1184–90. DOI: 10.3324/haematol.2014.107482. PMID: 24895336.
  16. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/nejmoa1312542. PMID: 24325359.
  17. Pardanani A.D., Levine R.L., Lasho T. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108(10):3472–6. DOI: 10.1182/blood-2006-04-018879. PMID: 16868251.
  18. Al Assaf C., Van Obbergh F., Billiet J. et al. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocytopenia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica* 2015;100(7):893–7. DOI: 10.3324/haematol.2014.118299. PMID: 25934766.
  19. Asp J., Andréasson B., Hansson U. et al. Mutational status of essential thrombocytopenia and primary myelofibrosis defines clinical outcomes. *Haematologica* 2016;101(4):e129–e132. DOI: 10.3324/haematol.2015.138958. PMID: 26768689.
  20. Rotunno G., Mannarelli C., Guglielmelli P. et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcomes in essential thrombocytopenia. *Blood* 2014;123(10):1552–5. DOI: 10.1182/blood-2013-11-538983. PMID: 24371211.
  21. Rumi E., Pietra D., Ferretti V. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocytopenia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014;123(10):1544–51. DOI: 10.1182/blood-2013-11-539098. PMID: 24366362.
  22. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Eds.: Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN: 978-92-832-2431-0.
  23. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22(1):14–22. DOI: 10.1038/sj.leu.2404955. PMID: 17882280.
  24. Tefferi A., Thiele J., Orazi A. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytopenia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *A. Leukemia* 2007;22(1):14–22. DOI: 10.1182/blood-2007-04-083501. PMID: 17488875.
  25. Thiele J., Kvasnicka H.M., Facchetti F. et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005;90(8):1128–32. PMID: 16079113.
  26. Carobbio A., Thiele J., Passamonti F. et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in who-defined essential thrombocytopenia: an international study of 891 patients. *Blood* 2011;117(22):5857–9. DOI: 10.1182/blood-2011-02-339002. PMID: 21490340.
  27. Passamonti F., Rumi E., Arcaini L. et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocytopenia: a study of 605 patients. *Haematologica* 2008;93(11):1645–51. DOI: 10.3324/haematol.13346. PMID: 18790799.
  28. Tefferi A., Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocytopenia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2017;92(1):94–108. DOI: 10.1002/ajh.24607. PMID: 27991718.
  29. Finazzi G., Rambaldi A., Guerini V. et al. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocytopenia and polycythemia vera according to JAK2V617F status. *Haematologica* 2007;92(1):135–6. PMID: 17229651.
  30. Finazzi G., Carobbio A., Guglielmelli P. et al. Calreticulin mutation does not modify the IPSET score for predicting the risk of thrombosis among 1150 patients with essential thrombocytopenia. *Blood* 2014;124(16):2611–2. DOI: 10.1182/blood-2014-08-596676. PMID: 25323688.
  31. Tefferi A., Wasse E.A., Lasho T.L. et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocytopenia. *Leukemia* 2014;28(12):2300–3. DOI: 10.1038/leu.2014.148. PMID: 24791854.
  32. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/nejmoa1311347. PMID: 24325356.
  33. Campbell P.J., MacLean C., Beer P.A. et al. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocytopenia: analysis of the prospective PT1 cohort. *Blood* 2012;120(7):1409–11. DOI: 10.1182/blood-2012-04-424911. PMID: 22709688.
  34. Carobbio A., Finazzi G., Guerini V. et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocytopenia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007;109(6):2310–3. DOI: 10.1182/blood-2006-09-046342. PMID: 17110452.
  35. Carobbio A., Antonioli E., Guglielmelli P. et al. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocytopenia. *J Clin Oncol* 2008;26(16):2732–6. DOI: 10.1200/jco.2007.15.3569. PMID: 18443353.
  36. Bertozzi I., Peroni E., Coltro G. et al. Thrombotic risk correlates with mutational status in true-essential thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 2016;46(8):683–9. DOI: 10.1111/eci.12647. PMID: 27271054.

## Вторичные солидные опухоли у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (клинические случаи и обзор литературы)

Ю.В. Скворцова<sup>1</sup>, Д.Н. Балашов<sup>1</sup>, Л.Н. Шелихова<sup>1</sup>, А.Е. Руднева<sup>1</sup>, М.А. Масчан<sup>1</sup>,  
Г.В. Терещенко<sup>1</sup>, Е.В. Скоробогатова<sup>2</sup>, И.В. Кондратенко<sup>2</sup>, С.С. Вахлярская<sup>2</sup>,  
И.Д. Бородина<sup>1</sup>, А.А. Бологов<sup>2</sup>, А.Г. Румянцев<sup>1</sup>, Е.В. Самочатова<sup>1</sup>, А.А. Масчан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

<sup>2</sup>ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России; Россия, 119571 Москва, Ленинский просп., 117

**Контакты:** Юлия Валериевна Скворцова [yusvco@mail.ru](mailto:yusvco@mail.ru)

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является эффективным методом лечения многих злокачественных и незлокачественных заболеваний. В связи с возрастанием доступности этого метода терапии с каждым годом увеличивается и количество реципиентов ТГСК с поздними осложнениями, среди которых вторичные неоплазии являются одними из наиболее угрожающих. Мы приводим характеристики различных видов вторичных солидных опухолей после аллогенной ТГСК и международные рекомендации по их скринингу и диагностике. Несколько клинических случаев нашего центра позволяют проиллюстрировать поздние эффекты аллогенной ТГСК.

**Ключевые слова:** аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, поздние эффекты, вторичные солидные опухоли

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-39-53

### Secondary solid tumors in children after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation: case reports and literature review

Skvortsova Yu.V.<sup>1</sup>, Balashov D.N.<sup>1</sup>, Shelichova L.N.<sup>1</sup>, Rudneva A.E.<sup>1</sup>, Maschan M.A.<sup>1</sup>, Tereshchenko G.V.<sup>1</sup>, Skorobogatova E.V.<sup>2</sup>, Kondratenko I.V.<sup>2</sup>, Vachlyarskaya S.S.<sup>2</sup>, Borodina I.D.<sup>1</sup>, Bologov A.A.<sup>2</sup>, Rumyantsev A.G.<sup>1</sup>, Samochatova E.V.<sup>1</sup>, Maschan A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev; Ministry of Healthcare of Russia, 1, Samory Mashela Str., Moscow, 117997, Russia;

<sup>2</sup>Russian Children Clinical Hospital; Ministry of Healthcare of Russia, 117, Leninskiy Prospect, Moscow, 119571, Russia

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an effective approach to cure numerous malignant and nonmalignant diseases. This method is more available now, respectively the number of survivors – recipients of HSCT increases every year. Among long-term complications of HSCT secondary solid cancers are one of the most life-threatening. We discuss different types of secondary solid tumours after HSCT and describe international recommendations of their screening and diagnostic. Several case reports from the single center could illustrate these serious late effects.

**Key words:** allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, late effects, secondary solid tumours.

#### Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) позволяет в настоящее время излечить множество злокачественных гематологических и негематологических заболеваний. Различные виды альтернативных ТГСК делают этот метод распространенным и более доступным для населения. Соответственно возрастает число реконвалесцентов, увеличивается длительность их жизни. Это создает предпосылки для реализации множества отдаленных осложнений ТГСК, с которыми сталкиваются сами пациенты и их доктора по месту жительства. Одним из таких серьезных осложнений являются вторичные

злокачественные заболевания. Ведь ТГСК, имеющая в составе кондиционирования высокодозные химиопрепараты и/или облучение, представляет собой фактор высокого риска развития вторичных злокачественных заболеваний. В настоящее время организованы Международный центр исследований ТГСК (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) и Европейская группа ТГСК (European Group for Blood and Marrow Transplantation), одним из предназначений которых является разработка скрининга вторичных злокачественных заболеваний после трансплантации костного мозга. С их помощью созданы руководства по скринингу неоплазий и проанализированы факто-

ры риска их развития [1] в целях разработки рекомендаций для пациентов и врачей относительно каждого вида злокачественных заболеваний.

Вторичные злокачественные заболевания после ТГСК можно разделить на 3 группы — посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, лейкозы/миелодисплазии и солидные опухоли.

В данной статье мы остановимся на обзоре вторичных солидных опухолей, приведем данные литературы, рекомендации международных сообществ, а также опишем клинические случаи из нашей практики.

### Обзор литературы и рекомендации

Вторичные солидные опухоли возникают в среднем через 5 лет после ТГСК. Встречаемость вторичных неоплазий нарастает со временем, даже спустя 20 лет после ТГСК исследования по мониторингу поздних осложнений не показывают достижения плато в их развитии. Наиболее распространенными локализациями являются полость рта, кожа, молочная и щитовидная железы [2]. По сравнению с общей популяцией пациенты после ТГСК имеют также повышенный риск развития неоплазий пищевода, печени, нервной системы, костей и соединительной ткани. Доказанными факторами риска являются миелоаблативное тотальное облучение тела (ТОТ), ранний возраст к моменту проведения ТГСК, хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и пролонгированная (свыше 24 мес) иммуносупрессивная терапия (ИСТ) [3]. Всех реципиентов ТГСК необходимо уведомлять о риске развития вторичных неоплазий и стимулировать их ежегодно проходить контрольные обследования и так называемый скрининг.

Многие организации разработали стандартизованные методы скрининга неоплазий, которые сейчас являются рутинным способом оценки общей популяции, однако требуются модификации для реципиентов ТГСК. В связи с этим утверждена рабочая группа при Международном центре исследований поздних эффектов после ТГСК, Рабочем комитете по качеству жизни (Center for International Blood and Marrow Transplant Research Late Effects and Quality of Life), Европейской группе по изучению поздних осложнений и качества жизни после ТГСК (European Group for Blood and Marrow Transplantation Complications and Quality of Life Working Party). Данная группа предлагает рекомендации по скринингу и предупреждению развития отдельных неоплазий у реципиентов ТГСК, которые будут приведены ниже. С помощью созданных руководств в последние годы удалось несколько повысить выживаемость пациентов со вторичными солидными опухолями после ТГСК — так, 5- и 10-летняя общая выживаемость в настоящее время составляют 50 и 46 % соответственно [4].

Остановимся на наиболее частых вторичных неоплазиях реципиентов ТГСК с учетом детской популяции.

### Рак кожи

Существует 3 главных типа рака кожи — базально-клеточный рак (БКР), плоскоклеточный рак (ПКР) и меланома. Средняя стандартизованная по возрасту частота встречаемости меланомы у мужчин и женщин составляет 3,3 и 2,8 на 100 тыс. человек соответственно [5]. По другим видам раков кожи такой статистики нет. Встречаемость резко варьирует в зависимости от стран и этнической принадлежности, наиболее высока она у европейцев. БКР и ПКР наиболее распространены и имеют более благоприятный прогноз по сравнению с другими раками кожи в общей популяции. Непосредственным предраком обоих состояний является актинический кератоз. Ежегодная трансформация его в рак описана в 0,03–20 % случаев. Хорошо известным фактором риска развития меланомы и других раков кожи является ультрафиолетовое облучение. А наиболее высоким риском признана длительная ИСТ (как у пациентов с хронической РТПХ, так и после пересадки солидных органов).

По данным статистики, встречаемость раков кожи после ТГСК составляет 105 на 100 тыс. человек для БКР, 76 для СКР и 18–76 для меланомы. По меньшей мере 5 крупных исследований описывают увеличение встречаемости меланомы после аллогенной ТГСК по сравнению с общей популяцией. Риск развития меланомы также повышен после проведения ТГСК с кондиционированием со сниженной токсичностью. Хроническая РТПХ, более молодой возраст и миелоаблативное тотальное облучение тела (разовая доза не менее 10 Гр или фракционированная доза не менее 13 Гр) — доказанные факторы риска для развития вторичных раков кожи [6–9]. Также описано, что применение вориконазола способно повышать риск развития рака кожи у реципиентов ТГСК и трансплантации солидных органов [10]. Не вполне определены факторы риска возникновения неоплазий у реципиентов ТГСК по поводу злокачественных заболеваний. Однозначным фактором риска развития вторичных раков кожи после ТГСК в детской популяции являются заболевания с повышенной ломкостью хромосом, как у детей с анемией Фанкони.

**Рекомендации.** Согласно вышеприведенным данным реципиенты ТГСК должны проходить ежегодное обследование по поводу новообразований кожи с целью более раннего выявления заболевания. Всем больным рекомендуется соблюдать правила защиты кожи от ультрафиолетового облучения — экранирование кожи одеждой и нанесение солнцезащитных кремов. Доказана эффективность этих мероприятий [11, 12]. Самый простой метод выявления раков кожи — физикальный осмотр. Повышенной настороженности требуют больные, перенесшие миелоаблативное ТОТ, дети, пациенты с хронической РТПХ, а также пациенты с врожденными заболеваниями с генетической нестабильностью, такими как анемия Фанкони.

При обнаружении на коже подозрительных образований необходимо проведение их тщательной оценки с возможной биопсией.

#### **Рак щитовидной железы**

Рак щитовидной железы является самым распространенным среди раков эндокринной системы. Встречаемость у мужчин и женщин составляет 1,9 и 6,1 на 100 тыс. человек соответственно [5]. За последние десятилетия частота встречаемости рака щитовидной железы медленно возрастает без изменений уровня смертности (0,5 летального исхода на 100 тыс. населения в год). Очевидно, это следствие более раннего выявления процесса. Хорошо известными факторами риска являются облучение и экспозиция к радиоактивным изотопам йода, хотя большинство дифференцированных раков щитовидной железы (папиллярный и фолликулярный) не связаны с облучением.

Данные о встречаемости рака щитовидной железы у реципиентов ТГСК противоречивы — ряд авторов описывают более высокие показатели по сравнению с общей популяцией [7], другие их не признают [13].

Рабочая группа при Европейской группе по изучению поздних осложнений и качества жизни после ТГСК проанализировала данные 68 936 пациентов, перенесших ТГСК в 1985–2003 гг. Она обнаружила более высокую встречаемость рака щитовидной железы по сравнению с общей популяцией — стандартизованный индекс встречаемости (standardized incidence ratio, SIR) составил 3,26 [14]. Мультивариантный анализ показал, что возраст менее 20 лет к моменту ТГСК являлся наиболее значимым фактором риска вторичного рака щитовидной железы: относительный риск, или индекс риска (risk ratio, RR), равнялся 24,6 для возраста 0–10 лет и 4,8 для 11–20 лет. Другими факторами риска являлись облучение (RR — 3,44), женский пол (RR — 2,79) и хроническая РТПХ (RR — 2,94). Средний интервал между ТГСК и развитием рака щитовидной железы составил 8,5 года.

**Рекомендации.** «Краеугольным камнем» скрининга рака щитовидной железы остается пальпация шеи (как минимум раз в год). Нет доказанного преимущества проведения ультразвукового исследования (УЗИ) щитовидной железы. Настороженность следует внушить лицам, получившим ТГСК в детском возрасте, реципиентам тотального облучения тела, женщинам и пациентам с хронической РТПХ.

#### **Орофарингеальный рак**

Встречаемость орофарингеального рака у мужчин и женщин составляет 5,5 и 2,5 на 100 тыс. населения соответственно [5]. Наиболее распространен ПКР полости рта. Его основными факторами риска являются курение и употребление алкоголя, среди других факторов — низкий социально-экономический статус, особенности диеты, недостаточная гигиена полости рта, жевание табака и бетеля, облучение и генетическая предрасположенность.

Среди вторичных раков у реципиентов ТГСК орофарингеальный рак встречается наиболее часто. Эта частота варьирует от 32 до 92 на 100 тыс. населения в год с риском в 7–16 раз выше по сравнению с общей популяцией. Риск орофарингеального рака также повышен у реципиентов ТГСК с кондиционированием со сниженной токсичностью (SIR — 46,7) [15]. Вероятность развития ПКР полости рта особенно высока у пациентов с хронической РТПХ, получавших ИСТ 24 мес и более [7–9, 16]. В дополнение к хронической РТПХ режимы кондиционирования с экранирующим облучением также являются факторами риска рака полости рта (RR — 4,7). Исследования на детских когортах показали повышенную встречаемость рака полости рта после аутологичных ТГСК [17]. Огромный риск развития орофарингеального рака у пациентов с анемией Фанкони, это наиболее частый вид вторичных неоплазий у данной категории больных. У иммунокомпрометированных пациентов значимую роль в развитии орофарингеального рака может играть вирус папилломы человека (ВПЧ).

**Рекомендации.** Все пациенты должны быть информированы о риске и симптомах орофарингеального рака. Рекомендуется ежегодно посещать стоматолога с оценкой предраковых состояний и биопсией подозрительных участков слизистой оболочки. Но первоначально оценить полость рта может любой врач, проводящий ежегодное физикальное обследование. Для пациентов с хронической РТПХ и другими факторами риска развития орофарингеального рака рекомендуется проводить скрининг каждые 6 мес. Профилактические мероприятия касаются образа жизни, гигиены, отказа от курения. Особого внимания требуют лица, получившие в детском возрасте ТГСК с облучением в режиме кондиционирования.

#### **Рак пищевода**

Средняя стандартизованная по возрасту частота встречаемости рака пищевода у мужчин и женщин составляет 9 и 3,1 на 100 тыс. населения соответственно [5]. В странах, где уровень курения невысок, наиболее частым подвидом является аденокарцинома, там же, где курение распространено, более типичен ПКР. Факторы риска развития рака пищевода — табакокурение, употребление алкоголя, низкий социально-экономический статус, диетические особенности, заболевания пищевода, предшествующие новообразования головы и шеи, применение бисфосфонатов, воздействие облучения и генетическая предрасположенность. Пищевод Баррета является наиболее частым предшественником аденокарциномы этого органа. К факторам, повышающим риск развития пищевода Баррета, относят принадлежность к европеоидной расе, старший возраст, ожирение, длительный гастроэзофагеальный рефлюкс.

Встречаемость рака пищевода у пациентов после ТГСК варьирует от 4 до 59 на 100 тыс. человек в год, SIR, в сравнении с общей популяцией, выше в 8,5–11

раз. Риск вторичного рака пищевода повышен у больных с хронической РТПХ и пациентов, получающих ИСТ 24 мес и более [16, 8]. Экстенсивная хроническая РТПХ является доказанным фактором риска с RR, равным 5,3. Информация по случаям рака пищевода после ТГСК в детской популяции очень ограничена.

**Рекомендации.** Реципиенты ТГСК должны быть проинформированы о возможности развития и симптомах рака пищевода. Больным с гастроэзофагеальным рефлюксом и дисфагией необходимо ежегодно проводить эзофагогастродуоденоскопию (ЭФГДС). Также эндоскопический скрининг рекомендуется для пациентов, получающих ИСТ 2 года и более, особенно если у них присутствуют такие симптомы, как дисфагия и изжога. Проведению ЭФГДС обязательно подлежат дети и взрослые с анемией Фанкони. Исследование пищевода с барием менее дорогостоящее и может также использоваться для скрининга, но его чувствительность неизвестна.

#### **Новообразования печени**

Ежегодно возрастает выявляемость гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Средняя встречаемость среди мужчин и женщин составляет 15,3 и 5,4 на 100 тыс. населения соответственно [5]. Потенциальными факторами риска являются хронические гепатиты В и С в анамнезе, хронические активные гепатиты и цирроз печени.

В некоторых исследованиях указывают на более высокий риск развития ГЦК у реципиентов как аутологичной, так и аллогенной ТГСК с миелоаблативным кондиционированием (риск выше в 6–28 раз по сравнению со здоровой популяцией) [7, 18]. Та же тенденция описана для реципиентов ТГСК с кондиционированием со сниженной токсичностью (SIR – 5,96) [15]. Факторами риска являются детский возраст к моменту ТГСК, хронический гепатит С в анамнезе, цирроз печени и ТОТ в составе кондиционирования. Нет данных о влиянии РТПХ на развитие ГЦК. Дополнительным фактором риска является гемосидероз вследствие предшествующих трансфузий [19, 20]. Перегрузка железом может приводить к развитию хронической болезни печени и/или последующему развитию ГЦК как при врожденных, так и при приобретенных гемосидерозах.

**Рекомендации.** Используются стандартные рекомендации для скрининга ГЦК (такие же, как для общей популяции): пациентам группы высокого риска каждые 6 мес проводят УЗИ органов брюшной полости с оценкой состояния печени.

#### **Рак молочной железы**

Рак молочной железы является наиболее распространенным и лидирующим по причине смертности от рака у женщин. Средняя частота встречаемости составляет 43,3 на 100 тыс. населения в год [5]. При введении программ скрининга удалось снизить летальность от рака молочной железы на 20–48 %.

Средняя встречаемость рака молочной железы у реципиентов ТГСК не превышает таковую в общей популяции. Однако при проведении ТГСК в раннем возрасте (особенно у детей младше 18 лет) риск развития рака молочной железы повышен [13, 21]. Встречаемость рака молочной железы возрастает параллельно удлинению срока после ТГСК – от 0,8 % (спустя 10 лет) до 4,6 и 11 % к 20 и 25 годам соответственно [21]. Выявлена ассоциация между проведением ТОТ в кондиционировании и повышенным риском развития рака молочной железы. Данный эффект более выражен при проведении ТГСК в возрасте младше 10 лет – наблюдается увеличение риска развития солидных опухолей в 55 раз по сравнению с общей популяцией. Риск остается повышенным в 4–6 раз у лиц, получивших ТГСК в возрасте 10–19 и 20–29 лет. Другие исследования сообщают о повышении риска развития рака молочной железы после применения анти-тимоцитарного глобулина (АТГ) [7] и ростовых факторов [22].

**Рекомендации.** Всем реципиентам ТГСК необходимо сообщать о риске развития рака молочной железы и важности обращения при первых тревожных симптомах (обнаружении узлов). После 40 лет пациентам рекомендуется ежегодное проведение физического обследования молочных желез и маммографии. Для получивших облучение грудной клетки или ТОТ необходим скрининг с возраста 25 лет или спустя 8 лет от окончания облучения – ежегодное клиническое обследование, маммография, магнитно-резонансная томография (МРТ) молочных желез [23]. Женщинам с повышенным риском развития рака молочной железы (например, носителей мутации гена *BRCA*) следует проводить мониторинг с более раннего возраста. Дополнительно к маммографии можно рекомендовать УЗИ молочных желез, но более предпочтительным является МРТ.

#### **Рак шейки матки и эндометрия**

Встречаемость рака шейки матки составляет 14 на 100 тыс. населения в год [5], но она несколько сократилась после внедрения в практику теста Папаниколау (Papnicolaou, Pap). Более чем в 80 % случаев – это ПКР, 10–20 % составляет аденокарцинома. На ранних стадиях рак шейки матки не проявляет себя, при прогрессировании же отмечаются патологическое кровотечение из половых путей, боли в области малого таза или во время полового акта (на поздних стадиях). Учитывая то, что вирус папилломы человека (такие подтипы как ВПЧ16 и ВПЧ18) встречаются более чем в 80 % случаев рака шейки матки, всех женщин желательнее вакцинировать от ВПЧ в возрасте 9–26 лет [24, 25]. Центры контроля над заболеваниями и их предупреждения рекомендуют проведение вакцинации от ВПЧ для девочек и мальчиков в возрасте 11–12 лет.

Частота встречаемости рака эндометрия составляет 8,2 на 100 тыс. в год [5]. Обычно этот вид рака развивается после менопаузы, первым симптомом

становится вагинальное кровотечение. Известными факторами риска являются ожирение и повышенный уровень эстрогенов. Часто данный рак развивается на месте гиперплазии эндометрия и в 80 % случаев является аденокарциномой.

Частота встречаемости рака шейки матки и рака эндометрия у реципиентов ТГСК составляет соответственно 2–67 и 2–7 на 100 тыс. человек в год [7, 22]. В нескольких исследованиях показано, что не выявлено возрастания частоты встречаемости по сравнению с общей популяцией. Факторами риска развития рака шейки матки у реципиентов ТГСК являются возраст более 34 лет и длительное течение хронической РТПХ (более 3 лет). ВПЧ-ассоциированная цервикальная дисплазия наблюдается у 1/3 выживших после аллогенной ТГСК (ВПЧ16 и ВПЧ18). Данные по развитию рака шейки матки и эндометрия в детской популяции очень ограничены.

**Рекомендации.** Скрининг и профилактика для реципиентов ТГСК включают в себя ежегодное исследование органов малого таза. Иммунокомпрометированным пациентам рекомендуется проведение вакцинации от ВПЧ, хотя ее эффективность для реципиентов ТГСК не доказана [25]. С этой целью необходимо введение 3 доз вакцины (начиная с 12 мес после ТГСК) как девочкам, так и мальчикам в возрасте 9–26 лет. Для женщин, получивших ТГСК в менопаузе, важно предоставление информации о риске развития рака эндометрия. Для реципиенток ТГСК рекомендуется проведение заместительной гормональной терапии комбинированными препаратами эстрогенов и прогестерона, так как изолированное применение эстрогенов повышает риск развития рака эндометрия.

#### **Рак яичника**

Очень мало исследований о встречаемости рака яичника после ТГСК. Не описано специфических факторов риска в связи с трансплантацией.

**Рекомендации.** Главным является выявление пациенток на раннем сроке заболевания. Необходимо проведение рутинного скрининга. Это включает в себя физикальный осмотр, трансвагинальное УЗИ и определение сывороточных уровней онкомаркера СА125.

#### **Рак яичка**

Обычно рак яичка манифестирует в возрасте 20–30 лет и составляет 1 % от всех злокачественных опухолей у мужчин [26]. Средняя встречаемость равна 1,5 на 100 тыс. населения в год [5]. Факторами риска являются крипторхизм/гипоспадия, наследственность, нарушение фертильности, табакокурение, избыточные масса тела и рост, ВИЧ-инфекция, европеоидная раса, испанское происхождение, экспозиция к органохлоринам.

Встречаемость рака яичка у реципиентов ТГСК составляет 4–5 на 100 тыс. в год без увеличения риска по сравнению с общей популяцией. Специфических факторов риска не выявлено.

**Рекомендации.** Не отличаются от общей популяции: ежегодное проведение физикального осмотра.

#### **Другие солидные опухоли**

У реципиентов ТГСК отмечается повышенный риск развития опухолей центральной нервной системы (ЦНС), сарком [22]. Необходимо выработать настороженность в отношении развития вторичных новообразований и своевременно обращать внимание на малейшие симптомы. Факторами риска развития вторичных опухолей ЦНС являются облучение ЦНС и ТОТ в анамнезе [27].

#### **Другие наблюдения**

Не выявлено различий во встречаемости вторичных солидных опухолей в зависимости от типа донора и HLA- (human leukocyte antigen – система лейкоцитарных антигенов человека) совместимости [7, 13]. Мало данных относительно риска трансплантации пуповинной крови и гаплоидентичных ТГСК. Риск развития вторичных опухолей выше у реципиентов ТГСК по поводу острого лейкоза и хронического миелолейкоза по сравнению с больными с доброкачественными заболеваниями. Риск развития ПКР кожи и полости рта выше у реципиентов мужского пола, а риск развития рака щитовидной железы и меланомы выше у женщин.

Конечно, показатели встречаемости могут различаться в зависимости от этнической принадлежности и уровня скрининга, проводимого в разных странах. Кроме того, вариации могут быть обусловлены недостаточными данными регистров, с учетом того что во многих центрах плохо ведется учет пациентов на длительных сроках после ТГСК.

Поэтому настоятельно рекомендуется поддерживать связь с пациентами после ТГСК и тщательно отмечать катamnестические данные. Непонятно, когда именно надо осуществлять скрининг после ТГСК на вторичные опухоли, так как их возникновение «растянуто» во времени. Так, по результатам исследования 47 697 пациентов с лечением злокачественных заболеваний в детском возрасте и наблюдением до возраста 79 лет кумулятивный риск вторичных опухолей повышался к возрасту 60–80 лет с преобладанием рака молочной железы, желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем у пациентов старше 60 лет. Реципиенты ТГСК в детском возрасте имеют повышенный риск вторичных неоплазий на протяжении всей жизни. Более надежным методом скрининга и раннего выявления вторичных опухолей у детей является диагностика ранних клинических проявлений/симптомов.

Факторы риска развития вторичных солидных опухолей и рекомендации по их скринингу приведены в табл. 1 и 2 соответственно [1]. Данные рекомендации являются результатом синтеза разработок, предложенных Американским онкологическим обществом и Национальной противораковой сетью США. Они активно используются для скрининга солидных опухолей

Таблица 1. Факторы риска вторичных опухолей у реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [1]

Table 1. Risk factors for secondary tumors in HSCT recipients [1]

Локализация Localization	Факторы риска Risk factors
Кожа Skin	Хроническая РТПХ Chronic GVHD
ПКР кожи Squamous cell carcinoma	Острая РТПХ, хроническая РТПХ, мужской возраст, возраст менее 18 лет к моменту ТГСК Acute GVHD, chronic GVHD, male gender, age less than 18 years by HSCT time
БКР кожи Basal cell carcinoma	Возраст менее 18 лет к моменту ТГСК, миелоаблативное ТОТ, европеоидная раса, хроническая РТПХ Age less than 18 years by HSCT time, myeloablative TBI, Europoid race, chronic GVHD
Меланома Melanoma	Миелоаблативное ТОТ, Т-клеточная деплеция, женский пол Myeloablative TBI, T-cell depletion, female gender
Щитовидная железа Thyroid	Облучение в кондиционировании, женский пол, возраст менее 20 лет к моменту ТГСК, хроническая РТПХ Irradiation in conditioning, female gender, age less than 20 years by HSCT time, chronic GVHD
Полость рта Oral cavity	Персистирующая хроническая РТПХ, ИСТ более 24 мес, включая профилактику, локализованное облучение, возраст менее 10 лет к моменту ТГСК, мужской пол Persistent chronic GVHD, IST more than 24 months, including preventive therapy; local irradiation; age less than 10 years by HSCT time; male gender
Пищевод Esophagus	Персистирующая хроническая РТПХ, пролонгированная ИСТ (более 24 мес) Persistent chronic GVHD, prolonged IST (more than 24 months)
Желудок Stomach	Не описаны Not reported
Толстая и прямая кишки Colon, rectum	Не описаны Not reported
Печень Liver	ТОТ, возраст менее 34 лет к моменту ТГСК, цирроз печени, хронический гепатит С TBI, age less than 34 years by HSCT time, cirrhosis, chronic hepatitis C
Легкое Lungs	Табакокурение перед ТГСК Smoking before HSCT
Молочная железа Breast	Миелоаблативное ТОТ или облучение грудной клетки, возраст менее 18 лет к моменту ТГСК, использование ростовых факторов, АТГ Myeloablative TBI or chest irradiation, age less than 18 years by HSCT time, use of growth factors, ATG
Шейка матки Cervix	Хроническая РТПХ и ИСТ более 3 лет, возраст более 34 лет Chronic GVHD and IST for more than 3 years, age over 34 years
Эндометрий Endometrium	Не описаны Not reported
Яичник Ovary	Не описаны Not reported
Простата Prostate	Не описаны Not reported
Яичко Testis	Не описаны Not reported
ЦНС CNS	Облучение ЦНС Cranial irradiation
Саркома Sarcoma	Не описаны Not reported

**Примечание.** БКР – базально-клеточный рак, ИСТ – иммуносупрессивная терапия, ПКР – плоскоклеточный рак, РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина», ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ТОТ – тотальное облучение тела, ЦНС – центральная нервная система.

**Note.** BCC – basal cell carcinoma, IST – immunosuppression therapy, SCC – squamous cell carcinoma, GVHD – graft-versus-host disease, HSCT – hematopoietic stem cell transplantation, TBI – total body irradiation, CNS – Central nervous system.

в общей популяции и были адаптированы для реципиентов ТГСК.

### Клинические случаи

Проанализированы отдаленные осложнения аллогенной ТГСК у 295 детей, получивших лечение в отделении трансплантации костного мозга ФГБУ «Российская детская клиническая больница» (РДКБ)

Минздрава России (Москва) за период с 1994 по 2011 г. и проживших минимум год после ТГСК. Минимальный срок наблюдения составил 5,5 года, максимальный – 23 года. В данной когорте выявлены 4 случая вторичных солидных опухолей (из них 2 у детей с анемией Фанкони) и 1 случай вторичной лимфомы Ходжкина. Ниже описаны 4 случая наблюдения вторичных солидных неоплазий.

Таблица 2. Руководство по скринингу общей популяции и реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [1]

Table 2. Guidelines for population and hematopoietic stem cell transplantation recipients screening [1]

Локализация Localization	Американское онкологическое общество American Cancer Society (ACS)	Национальная противораковая сеть США National Comprehensive Cancer Network (NCCN)	Рекомендации консенсуса для скрининга после ТГСК Consensus recommendations for screening after HSCT
Кожа Skin	Общий осмотр для мужчин и женщин старше 20 лет General examination for men and women over 20 years of age	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Осмотр кожи у всех реципиентов ТГСК, особенно имеющих факторы риска Skin examination in all HSCT recipients, especially those with risk factors
Щитовидная железа Thyroid	Общий контроль для мужчин и женщин старше 20 лет General control for men and women over 20 years of age	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Ежегодный осмотр, повышенная настороженность при факторах риска Annual examination, increased attention in the presence of risk factors
Полость рта Oral cavity	Общий контроль для мужчин и женщин старше 20 лет General control for men and women over 20 years of age	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Скрининг каждые 12 мес. Для пациентов с факторами риска осмотр каждые полгода Screening every 12 months. For patients with risk factors, the examination every 6 months
Пищевод Esophagus	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Эндоскопия с биопсией для лиц группы риска (наследственный синдром Баррета, Блума, анемия Фанкони) Endoscopy with biopsy for risk group (hereditary Barrett and Bloom syndromes, Fanconi anemia)	ЭФГДС для пациентов с ГЭР и дисфагией, эндоскопический скрининг для пациентов с хронической РТПХ и длительной ИСТ Gastroscopy for patients with gastro-oesophageal reflux and dysphagia, endoscopic screening for patients with chronic GVHD and long-term IST
Желудок Stomach	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Скрининг – как в общей популяции Screening as in the general population
Толстая и прямая кишки Colon, rectum	С возраста 50 лет: сигмоидоскопия каждые 5 лет, колоноскопия каждые 10 лет, исследование с барием каждые 5 лет, КТ-колонография каждые 5 лет. From 50 years of age: sigmoidoscopy every 5 years; colonoscopy every 10 years, with barium every 5 years; CT colonography every 5 years.	С возраста 50 лет: сигмоидоскопия каждые 5 лет, исследование кала на скрытую кровь ежегодно, колоноскопия каждые 10 лет. From 50 years of age: sigmoidoscopy every 5 years, feces for occult blood every year, a colonoscopy every 10 years.	Скрининг – как в общей популяции Screening as in the general population
Печень Liver	Для группы низкого риска (без цирроза и хронического гепатита) нет скрининга. Для группы риска ГЦК – определение АФП и УЗИ каждые 6–12 мес For a low-risk group (without cirrhosis and chronic hepatitis), there is no screening. For the HCC high-risk group – AFP and ultrasound every 6–12 months		Скрининг – как в общей популяции УЗИ печени каждые 6 мес у HBV серопозитивных пациентов или пациентов с циррозом в анамнезе Screening as in the general population Liver ultrasound every 6 months in HBV seropositive patients or patients with a history of cirrhosis

Локализация Localization	Американское онкологическое общество American Cancer Society (ACS)	Национальная противораковая сеть США National Comprehensive Cancer Network (NCCN)	Рекомендации консенсуса для скрининга после ТГСК Consensus recommendations for screening after HSCT
Легкое Lungs	Скрининг для пациентов 55–74 лет с табакокурением в анамнезе (минимум 30 пачек в год), курящих в настоящее время и бросивших курение на протяжении последних 15 лет. Низкодозная КТ Screening for patients 55–74 years old with a history of smoking (at least 30 packs per year) who currently smoke and who have given up smoking during the past 15 years. Low-dose CT	Скрининг с проведением низкодозной КТ для 2 групп риска: более 55 лет с табакокурением (не менее 30 пачек в год), более 50 лет, выкуривающие менее 20 пачек в год с одним из дополнительных факторов риска (работа с радоном, асбестом, рак легкого у родителей, пассивное курение) Screening with low-dose CT for 2 risk groups: more than 55 years old with tobacco smoking (at least 30 packs per year), more than 50 years old, smoked less than 20 packs per year with one of the additional risk factors (work with radon, asbestos, lung cancer in parents, passive smoking)	Скрининг – как в общей популяции. Рекомендация бросить курение. Скрининг при дополнительных факторах риска (курение) Screening as in the general population. Recommendation to quit smoking. Screening for additional risk factors (smoking)
Молочная железа Breast	<i>Средний риск:</i> 20–40 лет – осмотр молочных желез каждые 3 года, более 40 лет – ежегодный осмотр и маммография. <i>Высокий риск:</i> ежегодная маммография и МРТ, начиная с 30 лет <i>Intermediate risk:</i> 20–40 years old – examination of breast every 3 years, more than 40 years old – annual examination and mammography. <i>High risk:</i> annual mammography and MRI, starting at age 30	<b>САМООБСЛЕДОВАНИЕ</b> <i>Средний риск:</i> 25–40 лет – осмотр молочных желез каждые 1–3 года, более 40 лет – ежегодный осмотр и маммография. <i>Высокий риск (облучение):</i> менее 25 лет – ежегодный осмотр, начиная с 8–10 лет после облучения; более 25 лет – ежегодная маммография и осмотр молочных желез, начиная с 8–10 лет после облучения или достижения возраста 40 лет, ежегодная МРТ <b>SELF-EXAMINATION</b> <i>Intermediate risk:</i> 25–40 years old – examination of breast every 1–3 years, more than 40 years old – annual examination and mammography. <i>High risk (irradiation):</i> less than 25 years old – an annual examination, starting from 8–10 years after irradiation; more than 25 years old – an annual mammogram and examination of breast, starting from 8–10 years after irradiation or after 40 years of age, an annual MRI	<b>НАСТОРОЖЕННОСТЬ ДЛЯ ВСЕХ ПАЦИЕНТОВ</b> <i>Средний риск:</i> 20–40 лет – осмотр молочных желез каждые 1–3 года, более 40 лет – ежегодный осмотр и маммография. <i>Облучение или TOT:</i> с возраста 25 лет или 8 лет после облучения, но не позднее достижения 40 лет – ежегодный осмотр, маммография и МРТ молочных желез <b>ATTENTION FOR ALL PATIENTS</b> <i>Intermediate risk:</i> 20–40 years old – examination of breast every 3 years, more than 40 years old – annual examination and mammography. <i>Irradiation or TBI:</i> from the age of 25 years or 8 years after irradiation, but not later than 40 years of age – annual examination, mammography and MRI of the breast
Шейка матки Cervix	Пап-тест для женщин 21–29 лет каждые 3 года. Пап-тест и определение ДНК ВПЧ для женщин 30–65 лет каждые 5 лет. Ежегодный скрининг – для пациенток со сниженным иммунитетом Pap-test for women 21–29 years old every 3 years. Pap-test and HPV DNA detection for women 30–65 years old every 5 years. Annual screening for patients with reduced immunity		Ежегодный Пап-тест и определение ДНК ВПЧ Annual Pap-test and HPV DNA detection
Эндометрий Endometrium	Информирование о факторах риска и симптомах для женщин в менопаузе Information on risk factors and symptoms for women in menopause	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Скрининг – как в общей популяции Screening as in the general population

Окончание таблицы 2

End of table 2

Локализация Localization	Американское онкологическое общество American Cancer Society (ACS)	Национальная противораковая сеть США National Comprehensive Cancer Network (NCCN)	Рекомендации консенсуса для скрининга после ТГСК Consensus recommendations for screening after HSCT
Яичник Ovary	Нет специфических рекомендаций для среднего риска. Для высокого риска (врожденный синдром билатерального рака яичника, мутация BRCA1/2 или синдром Линча) – ежегодное исследование малого таза, СА125, трансвагинальное УЗИ до рождения ребенка или возраста 35 лет, далее рекомендуется профилактическая билатеральная оофорэктомия No specific recommendations for intermediate risk group. For high-risk group (congenital syndrome of bilateral ovarian cancer, BRCA1/2 mutation or Lynch syndrome) – annual pelvic examination, CA125, transvaginal ultrasound before delivery or 35 years of age; further preventive bilateral oophorectomy is recommended	Нет специфических рекомендаций для среднего риска. Для высокого риска (врожденный синдром билатерального рака яичника, мутация BRCA1/2) – определение СА125 и трансвагинальное УЗИ каждые 6 мес с возраста 30 лет или на 5–10 лет ранее No specific recommendations for intermediate risk group. For high-risk group (congenital syndrome of bilateral ovarian cancer, BRCA1/2 mutation) – CA125 and transvaginal ultrasound every 6 months after 30 years of age or 5–10 years earlier	Скрининг – как в общей популяции Screening as in the general population
Простата Prostate	ПСА + пальцевое исследование прямой кишки PSA + digital rectal examination		Скрининг – как в общей популяции Screening as in the general population
Яичко Testis	Общий осмотр мужчин с возраста 20 лет General examination of men after 20 years of age	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations	Скрининг – как в общей популяции Screening as in the general population
ЦНС CNS	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations		
Саркома Sarcoma	Нет специфических рекомендаций No specific recommendations		

**Примечание.** BRCA1/2 – гены BRCA1/2, CA125 – онкомаркер, HBV – вирус гепатита В, Pap-тест – цитологический мазок Папаниколау, AFP – альфа-фетопроtein, ВПЧ – вирус папилломы человека, ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома, ГЭР – гастроэзофагеальный рефлюкс, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, ИСТ – иммуносупрессивная терапия, КТ – компьютерная томография, МРТ – магнитно-резонансная томография, ПСА – простатоспецифический антиген, РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина», ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ТОТ – тотальное облучение тела, УЗИ – ультразвуковое исследование, ЦНС – центральная нервная система, ЭФГДС – эзофагогастродуоденоскопия.

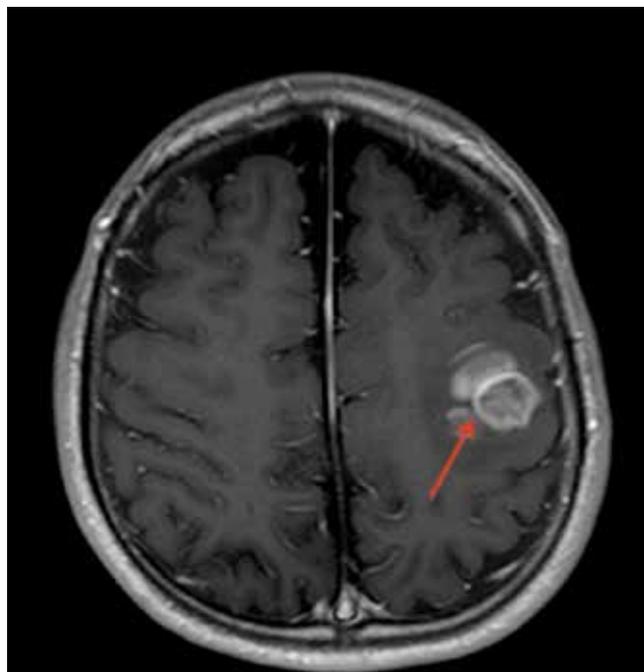
*Note.* BRCA1/2 – genes BRCA1/2, CA125 – tumor marker, HPV – the human papilloma virus, Pap-test – cytology smear Papanicolaou, AFP – alpha-fetoprotein, HPV – the human papilloma virus, HCC – hepatocellular carcinoma, DNA – deoxyribonucleic acid, IST – immunosuppression therapy, CT – computed tomography, MRI – magnetic resonance imaging, PSA – prostate specific antigen, GVHD – reaction «transplant against host», HSCT – hematopoietic stem cell transplantation, TBI – total body irradiation, CNS – Central nervous system.

### Клинический случай 1

**Пациент К.** заболел в возрасте 6,5 года, когда было выявлено увеличение шейных лимфатических узлов (ЛУ). Первоначальный диагноз по пункционным биопсиям указывал на реактивную гиперплазию; после проведения открытой биопсии установлен диагноз неходжкинской В-лимфобластной лимфомы. Ликвор и костный мозг оставались интактны. Получал полихимиотерапию (ПХТ) по протоколу VFM-NHL-90 для В-клеточных

лимфом (блоки АА №3 и ВВ №3). Через 4 мес после терапии повторно отмечалось увеличение шейного ЛУ. Гистологическое исследование его биоптата подтвердило наличие лимфомы, идентичной первичной. Проведены 4 блока ПХТ и аутологичная ТГСК с ритуксимабом. Через год вновь отмечалось увеличение ЛУ. Гистологическое заключение – В-клеточная лимфобластная лимфома. Получал ПХТ по протоколу ALL-BFM-REZ (всего 6 блоков), после чего осуществлена лучевая терапия

на область шейно-надключичных ЛУ в суммарной облучающей дозе (СОД) 36 Гр. В дальнейшем проведены лечение по протоколу Total XIII, затем поддерживающая терапия 6-меркаптопурином и метотрексатом. Через 3 года от манифестации заболевания в возрасте 10 лет больному выполнена аллогенная ТГСК от НЛА-идентичного неродственного донора. Режим кондиционирования включал в себя тресульфан в дозе 42 г/м<sup>2</sup>, флударабин (150 мг/м<sup>2</sup>), тиоптепу (300 мг/м<sup>2</sup>) и алемтузумаб (1 мг/кг) (здесь и далее указаны суммарные дозы). Клеточность трансплантата составила:  $NC = 6 \times 10^8$ /кг,  $CD^{34+} = 3,8 \times 10^6$ /кг. Профилактику острой РТПХ осуществляли такролимусом и микофенолата мофетиллом. Приживление трансплантата зарегистрировано на 16-й день. Ранние осложнения были минимальны – мукозит II степени, токсидермия, фебрильная нейтропения. ИСТ отменена через месяц. Регулярно наблюдался в РДКБ и ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (ННПЦ ДГОИ), признаков рецидива, РТПХ не отмечалось. Вел активный образ жизни. В возрасте 17 лет (через 7 лет от момента проведения аллогенной ТГСК) у юноши резко развились слабость и судороги в правой руке, отмечался эпизод потери сознания, спустя несколько дней – повторный приступ, в дальнейшем – несколько эпизодов тонического напряжения и клонических подергиваний в правой руке. При МРТ головного мозга выявлено новообразование в левой лобно-теменной области, провели дифференциальную диагностику между рецидивом основного заболевания и глиальной опухолью (рис. 1). При исследовании ликвора выявлен лимфоцитоз, пунктат костного мозга из 4 точек – без патологии. Спинной мозг, по данным МРТ, интактен. В ННПЦ ДГОИ выполнена биопсия опухоли. Гистологическое исследование подтвердило глиобластому. Через месяц проведена 2-я операция по удалению опухоли. Гистологическое заключение аналогично. Пациент получал лучевую терапию локально на ложе опухоли до СОД 59,4 Гр с параллельной химиотерапией (ХТ) темозоломидом в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> в сутки. Контрольная МРТ головного мозга выявляла точечное накопление контрастного вещества по периферии послеоперационной кисты. Проведено 9 циклов метронимной ХТ темозоломидом в дозе 150–200 мг/м<sup>2</sup> в 1–5-е дни каждые 28 дней. На протяжении года в дальнейшем, по результатам МРТ головного мозга, данных о продолженном росте не отмечалось. По месту жительства больному однократно введена дендритная вакцина. Однако через год после окончания ХТ появились жалобы на периодическое чувство онемения в правой руке и ноге. МРТ выявила отрицательную динамику со стороны образования в проекции левого таламуса (которое расценивалось как постлучевые изменения) с распространением на левую ножку мозга без признаков накопления контрастного вещества. По данным ПЭТ головного мозга с метионином, в левых передних подкорковых ядрах, зрительном бугре с распро-



**Рис. 1.** МРТ в режиме T1+C, аксиальная проекция. На МР-изображении определяется контрастопозитивное внутримозговое патологическое объемное образование лобно-теменной области левого полушария головного мозга (глиома)

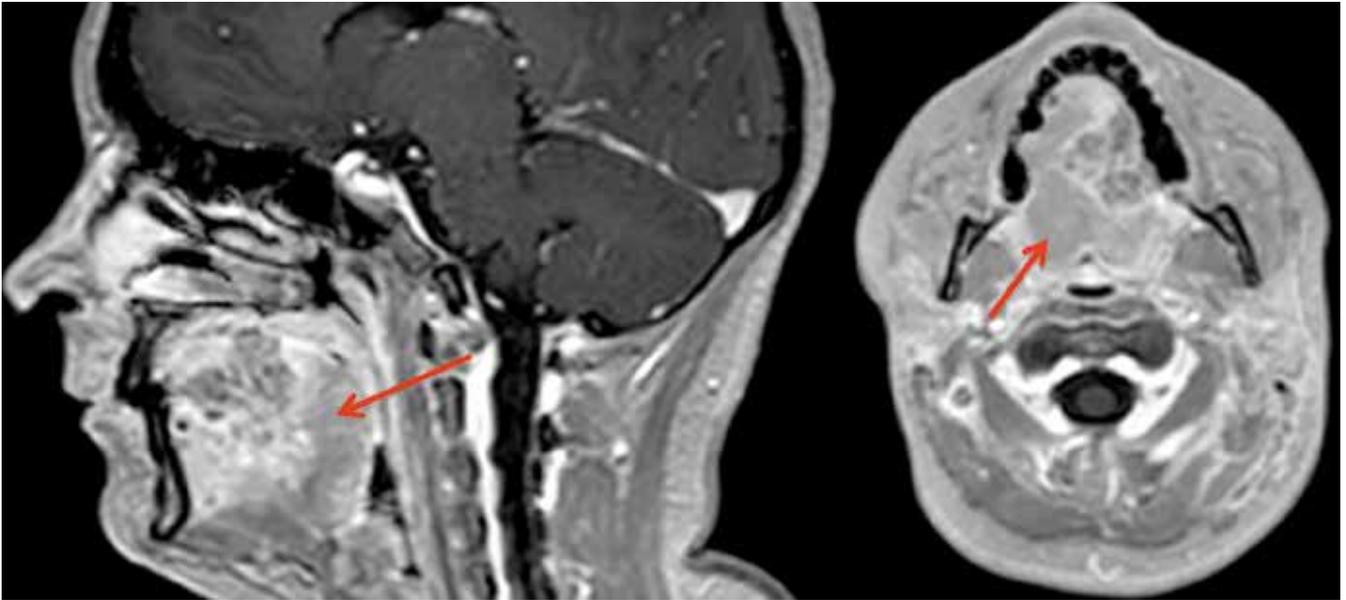
**Fig. 1.** MRI in T1 + C, axial projection. Contrast-positive intracerebral pathological mass in the fronto-parietal region of the left brain hemisphere (glioma)

странением на ножки мозга и мост определялся участок патологического накопления радиофармпрепаратов, а также аметаболический очаг в левой теменной доле, обусловленный послеоперационной кистой. Эти данные наиболее соответствовали метастазированию глиобластомы или появлению нового новообразования – диффузной глиомы моста. Клинически состояние продолжало ухудшаться. Начат прием дексаметазона в дозе 8 мг/сут. Юноша постоянно получал противосудорожную терапию вальпроевой кислотой.

Пациент был выписан с рекомендациями для продолжения лучевой и ПХТ по месту жительства. Проводимое лечение эффекта не дало. Юноша умер через 3 мес, спустя 2 года от момента манифестации клиники глиобластомы.

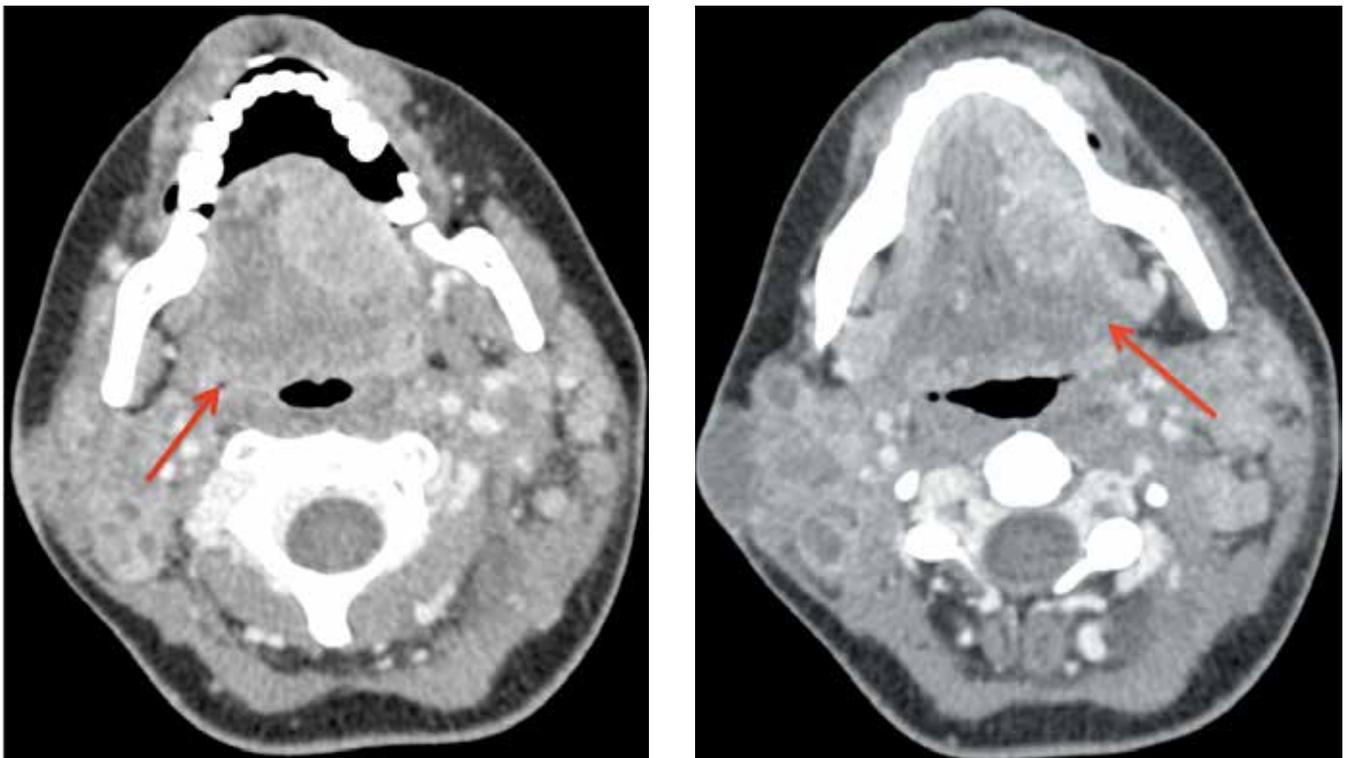
### Клинический случай 2

**Пациентке М.** в возрасте 4 лет поставлен диагноз врожденной анемии Фанкони, по поводу которой она перенесла аллогенную трансплантацию костного мозга в возрасте 7 лет в отделении трансплантации костного мозга РДКБ. До момента трансплантации девочка принимала кортикостероиды и получала метандростенолон без существенного эффекта. Донором явилась НЛА-совместимая сестра. Режим кондиционирования включал в себя бусульфан в дозе 4 мг/кг, флударабин (150 мг/м<sup>2</sup>), АТГ (90 мг/кг). Характеристики трансплантата:  $NC = 3,2 \times 10^8$ /кг,  $MNC = 1,6 \times 10^8$ /кг. Профилактика острой РТПХ осуществлялась циклоспорином и коротким курсом мето-



**Рис. 2.** МРТ-исследование в режиме T1+C, сагиттальная аксиальная проекции. На МР-изображении с контрастным усилением определяется объемное образование языка с распространением на окружающие ткани

**Fig. 2.** MRI in T1 + C, sagittal axial projection. Tumor mass of the tongue with spreading to surrounding tissues



**Рис. 3.** КТ-исследование в вензную фазу. На КТ-изображении с контрастным усилением определяется объемное образование языка с участками гиподенсивной плотности, неоднородно накапливающее контрастный препарат. Помимо этого, отмечаются конгломераты увеличенных лимфатических узлов

**Fig. 3.** CT in the venous phase with contrast enhancement. Tumor mass of the tongue with areas of hypodensity and with inhomogeneous accumulation of contrast

трексата, 4-кратным введением даклизумаба. Прижизненное нейтрофилов зарегистрировано на 14-й день. Получала гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) в связи с фебрильной нейтропенией. На 25-й день у ребенка развилась острая РТПХ II стадии с пораже-

нием кишечника и печени. Проведена терапия кортикостероидами в дозе 1 мг/кг с эффектом. Данных о наличии хронической РТПХ нет, так как девочка не приезжала на контрольные обследования. Спустя 11,5 года появилось незначительное образование на языке, которое постепенно

увеличивалось в размерах. Обратилась к врачу по месту жительства. Был заподозрен рак языка, выполнена биопсия, патологическое заключение: высокодифференцированный ПКР языка. По данным МРТ: картина рака левой половины тела языка с распространением за срединную борозду и вовлечением корня языка. Метастатическое поражение ЛУ подбородочной области и шеи слева. Увеличение подчелюстных ЛУ и шеи справа (метастазы?). По данным цитологического исследования пунктата ЛУ – метастазы ПКР. Госпитализирована в ННПЦ ДГОИ, где подтвержден диагноз: «Высокодифференцированный плоскоклеточный рак языка IVa стадии по AJCC T3N2cM0. Прогрессирование: метастазы в лимфатические узлы шеи». Решением консилиума принято проведение на 1-м этапе ХТ препаратом доцетаксел в дозе 75 мг/м<sup>2</sup>/сут. После проведения 2 курсов больной было предложено радикальное хирургическое лечение. Однако от данного лечения девушка отказалась и в дальнейшем на плановую госпитализацию не явилась. Через 4 мес пациентка снова поступила в ННПЦ ДГОИ с резко выраженной отрицательной динамикой по клиническим данным и КТ-картине (рис. 2 и 3): образование языка увеличилось в несколько раз, состояло из нескольких узлов, в его толще определялись участки гиподенсивной плотности – распад. Образование интимно прилежит к левой половине тела нижней челюсти. Значительно увеличилось в размерах ЛУ шеи, с формированием конгломератов, охватывающих крупные сосуды. Снова созван консилиум: учитывая распространенность основного заболевания, невозможность выполнения радикальной операции, больная признана некурабельной. Начата метрономная ХТ препаратом капецитабин в дозе 625 мг/м<sup>2</sup> 2 раза в день. Выполнены установка порта, гастростомия (в связи с невозможностью самостоятельно питаться). Отмечалась некоторая положительная динамика в виде уменьшения размеров ЛУ шеи, появилась подвижность шеи, возможность самостоятельно глотать. По данным контрольных КТ- и МРТ-исследований вторичное злокачественное заболевание прогрессировало. Больной продолжена метрономная терапия капецитабином.

На фоне проводимой терапии отмечалось значительное сокращение размеров шейных ЛУ, уменьшение болевого синдрома. Однако сохранялась потребность в ежедневном приеме нестероидных противовоспалительных средств, трамадола. Параллельно у пациентки отмечались гормональные нарушения – вторичная аменорея, преждевременная яичниковая недостаточность, субклинический гипотиреоз, гиперпролактинемия, а также депрессивное состояние, нарушение сна. Получала симптоматическую терапию.

Девушка была выписана для продолжения метрономной терапии по месту жительства. Новобразование прогрессировало, и пациентка умерла через 2 мес.

### Клинический случай 3

Пациент Л. болен врожденной анемией Фанкони, по поводу чего перенес аллогенную трансплантацию пуповинной крови и костного мозга от НЛА-совместимой

сестры в возрасте 13 лет в отделении трансплантации костного мозга РДКБ. Режим кондиционирования включал в себя бусульфан (4 мг/кг), флударабин (150 мг/м<sup>2</sup>), АТГ (90 мг/кг). Характеристики трансплантата: NC =  $1,3 \times 10^8$ /кг, MNC =  $0,8 \times 10^8$ /кг. Профилактика острой РТПХ осуществлялась циклоспорином и коротким курсом метотрексата. Приживление нейтрофилов зарегистрировано на 12-й день. Отмечалась ограниченная кожная РТПХ с переходом в хроническую форму, по поводу которой мальчик получал кортикостероиды в дозе 1 мг/кг с эффектом. Отмена циклоспорина проведена через 2 года от момента ТГСК, с тех пор пациент на контрольные обследования не являлся. Через 14 лет от момента ТГСК у юноши появились неприятные ощущения на слизистой ротовой полости в области задних зубов справа, болезненность при широком открывании рта. При обследовании обнаружено появление участков изъязвления слизистой с обнажением корней зубов. Стоматологом поставлен диагноз пародонтита, по результатам цитологического исследования патологических клеток не обнаружено. Однако образование увеличивалось в размерах. Проведено КТ-исследование головы: выявлена деструкция альвеолярного отростка и тела верхней челюсти справа с локальным утолщением мягких тканей, оголением верхушек корней боковых зубов. Больной обратился в поликлинику ННПЦ ДГОИ, где проведена биопсия десен; гистологическое заключение – плоскоклеточная ороговевающая карцинома. Направлен на лечение в МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России. Поставлен диагноз: «Рак слизистой альвеолярного отростка верхней челюсти справа III T3N0M0». Пациенту проведена эмболизация правой верхнечелюстной артерии с последующей резекцией верхней челюсти справа с радиочастотной абляцией раневой поверхности. Гистологическое исследование удаленного образования подтвердило наличие высокодифференцированного ПКР с распространением на слизистую альвеолярного отростка, мягкие ткани щеки, с вращением в малые слюнные железы. Несмотря на оперативное вмешательство, сохранялся инфильтративный продолженный рост опухоли.

Через 4 мес от момента операции, по данным МРТ, в области операции, кнутри от ветви нижней челюсти, определялась зона опухолевой инфильтрации с распадом, с распространением на слизистую дна полости рта справа, правую стенку ротоглотки, тесным прилеганием к правой половине корня языка. В верхней и средней трети шеи справа выявлены вторично измененные ЛУ. Юноше осуществлено 2 внутриартериальных регионарных введения химиопрепарата доцетаксел, 2 внутривенных введения цисплатина – без существенного эффекта. Затем в течение полугода получал терапию цетуксимабом. Изначально отмечен регресс образования, однако в последующем опять появился продолженный рост. Пациент дважды получал препарат ниволумаб с незначительным клиническим эффектом в виде замедления



Рис. 4. Нативное МСКТ-исследование. Образование в проекции угла нижней челюсти справа с деструкцией кортикальной пластинки угла нижней челюсти

Fig. 4. Native MSCT. Tumor mass in the projection of the right mandible angle with destruction of the cortical plate

роста опухоли. По данным МРТ и КТ, через год от момента хирургического лечения сохраняется картина объемного образования с полостью распада и наличием свищевого хода в щечной области справа (рис. 4).

Учитывая минимальный положительный эффект от проводимой ХТ и иммунной терапии, настоятельно рекомендовано начать лучевую терапию на рецидивную опухоль — стандартную или протонную — на фоне приема цетуксимаба, который является радиомодификатором. Но ситуация может осложниться побочными реакциями на лучевую терапию, риск которых чрезвычайно повышен у пациентов с анемией Фанкони.

В настоящее время юноша решает вопрос об осуществлении лучевой терапии.

#### Клинический случай 4

**Пациент А.** был болен с рождения частыми гнойными инфекциями. По месту жительства поставлен диагноз первичного иммунодефицита, гипер-IgM-синдрома (подтвержденный впоследствии на молекулярном уровне), по поводу которого мальчик в возрасте 4 лет перенес аллогенную трансплантацию костного мозга от HLA-совместимого брата. Кондиционирование включало в себя тресульфан ( $36 \text{ г/м}^2$ ), флударабин ( $150 \text{ мг/м}^2$ ) и циклофосфамид ( $120 \text{ мг/кг}$ ). Клеточность трансплантата была достаточной:  $\text{NC} = 6,5 \times 10^8/\text{кг}$ ,  $\text{CD34}^+ = 3,5 \times 10^6/\text{кг}$ . Профилактика острой РТПХ проводилась

циклоспорином и микофенолата мофетиллом. Ранний посттрансплантационный период осложнился развитием респираторной инфекции. Восстановление лейкопоза на фоне стимуляции Г-КСФ отмечено на 20-й день. Отмечалась реактивация цитомегаловируса, потребовавшая терапии ганцикловиром. В дальнейшем длительно сохранялась персистенция смешанного химеризма с развитием иммунного отторжения через 2 года от момента ТГСК. Выполнена повторная аллогенная ТГСК от HLA-совместимой сестры с использованием флударабин-содержащего режима кондиционирования со сниженной токсичностью. Данная ТГСК осложнилась развитием острой РТПХ II–III стадии с поражением кожи и кишечника. Ответ получен на терапию кортикостероидами и циклофосфамидом. Однако после отмены кортикостероидов произошло развитие хронической РТПХ с преимущественным поражением кожи (вплоть до склеродермии) и верхних отделов кишечника (подтверждено биопсией). Получал терапию кортикостероидами, будесонидом, рапамицином, микофенолата мофетиллом без существенной динамики со стороны кожного поражения.

В дальнейшем проведено 6 введений циклофосфамида, 3 введения ритуксимаба. Достигнута умеренная положительная динамика в виде уменьшения очагов склероатрофии. Параллельно отмечалось множество гнойных инфекций.

Из прочих осложнений обращали на себя внимание полинейромиопатия, миокардиодистрофия, субклинический гипотиреоз, побочные эффекты кортикостероидов, остеопения. Через 3,5 года от момента последней ТГСК у пациента отмечено появление округлого образования в области околоушной слюнной железы справа. Заподозрен сиалоденит/лимфаденит. Эмпирическая антибактериальная терапия эффекта не оказала. Выполнена пункционная биопсия образования, оказавшаяся неинформативной. Принято решение об оперативном вмешательстве — проведена субтотальная резекция правой околоушной слюнной железы. По данным гистологического исследования, выявлена высокодифференцированная мукоэпителиоидная аденокарцинома. Планировали проведение облучения ложа опухоли. Однако, по результатам МРТ и УЗИ ложа образования, через 2 мес после момента оперативного вмешательства данных об остаточной опухоли не получено, от облучения было решено воздержаться. У мальчика отмечалась повторная реактивация хронической РТПХ с поражением кожи и легких, что потребовало введения ритуксимаба. Длительно продолжался прием рапамицина.

В настоящее время состояние пациента стабильное, ближе к удовлетворительному, полгода не получает ИСТ, качество жизни нарушено вследствие множества сопроводительных побочных эффектов (доминируют проявления вторичного нервно-мышечного синдрома и хронического гастродуоденита). Данных о рецидиве/прогрессии вторичной опухоли нет.

**Заключение**

Наши клинические случаи отражают общую ситуацию со вторичными солидными новообразованиями после ТГСК, хотя опубликовано очень мало данных по исследованиям популяции, перенесшей ТГСК в детском возрасте.

Случай развития опухоли ЦНС у пациента после множественных курсов ПХТ, 2 ТГСК и облучения представляет собой пример риска канцерогенеза под воздействием перенесенного длительного лечения с включением алкилирующих препаратов и вследствие изменения гомеостаза и снижения противоопухолевой защиты организма под воздействием химиотерапевтических и радиационных факторов. Учитывая объем полученной терапии, такому пациенту необходимо проведение более частого мониторингования поздних эффектов. К сожалению, МРТ головного мозга не входит в стандартную схему скрининга, поэтому шанс выявить глиобластому на самых ранних сроках до клинической презентации был невелик.

Показательны 2 случая развития ПКР слизистой оболочки полости рта у пациентов с анемией Фанкони. Этот вид рака является наиболее типичным и часто встречающимся в данной группе больных. К сожалению, оба пациента получили ТГСК много лет назад, когда вопросы отдаленных осложнений не обсуждались с больными подробно. Они не проходили плановые и регулярные контрольные исследования, очевидно, не имели достаточной настороженности относительно развития вторичных неоплазий. Поэтому оба примера отражают регистрацию заболевания на стадии запущенного процесса, когда лечение представляет большую сложность как в плане ответа, так и в отношении выраженных побочных эффектов вследствие повышенной чувствительности соматических клеток пациентов с анемией Фанкони к химиоте-

рапевтическим и лучевым воздействиям. В настоящее время таким больным очень подробно разъясняется риск развития злокачественных заболеваний и необходимость частого и регулярного мониторингования. В случае обнаружения у больных анемией Фанкони подозрительных участков на слизистых оболочках или коже проведение расширенной биопсии образований с тщательным гистологическим исследованием обязательно.

Случай развития вторичной опухоли у мальчика с первичным иммунодефицитом также подтверждает теорию канцерогенеза вследствие нарушения иммунного контроля, воздействия повреждающих факторов (2-я ТГСК), формирования выраженного иммунного дисбаланса (хроническая РТПХ, длительная ИСТ).

Пациентов, получивших 2 и более ТГСК, а также страдающих хронической РТПХ и получающих ИСТ более 2 лет, относят к группе высокого риска развития вторичных неоплазий. Они должны подвергаться более частому и тщательному мониторингу, желательнее с быстрым обращением в многопрофильные центры с целью как можно более раннего выявления и лечения патологического процесса.

С учетом возрастания количества и значимости поздних осложнений после ТГСК на протяжении последних 10 лет мы стараемся мотивировать всех пациентов после аллогенной ТГСК проходить ежегодный плановый осмотр с предоставлением результатов обследования по месту жительства. Созданы схемы мониторинга поздних осложнений. Помимо этого для каждого пациента формируют индивидуальные графики обследований с учетом факторов риска перенесенного лечения. Только комплексное взаимодействие реципиента ТГСК, его родителей, врачей, консультантов и регулярное проведение скрининга поможет адекватному и своевременному выявлению и лечению вторичных неоплазий.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES**

- Inamoto Y., Shah N.N., Savani B.N. et al. Secondary solid cancer screening following hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(8):1013–23. DOI: 10.1038/bmt.2015.63.
- Inamoto Y., Lee S.J. Late effects of blood and marrow transplantation. *Haematologica* 2017;102(4):614–25. DOI: 10.3324/haematol.2016.150250. PMID: 28232372.
- Tichelli A., Rovo A. Long-term outcome after hematopoietic stem cell transplant in patients with aplastic anemia. *Curr Drug Targets* 2016;22. [Epub ahead of print]. PMID: 27339193.
- Ehrhardt M.J., Brazauskas R., He W. et al. Survival of patients who develop solid tumors following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2016;51(1):83–8. DOI: 10.1038/bmt.2015.203. PMID: 26367222.
- Stewart B.W., Wild C.P. et al. World Health Organisation. 1st edition. International Agency for Research in cancer (IARC). 2014.
- Curtis R.E., Metayer C., Rizzo J.D. et al. Impact of chronic GVHD therapy on the development of squamous-cell cancers after hematopoietic stem cell transplantation: an international case-control study. *Blood* 2005;105:3802–11. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3411. PMID: 15687239.
- Rizzo J.D., Curtis R.E., Socié G. et al. Solid cancers after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2009;113:1175–83. DOI: 10.1182/blood-2008-05-158782. PMID: 18971419.
- Atsuta Y., Suzuki R., Yamashita T. et al. Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol* 2014;25:435–41.

- DOI: 10.1093/annonc/mdt558.  
PMID: 24399081.
9. Leisering W., Friedman D.L., Flowers M.E. et al. Nonmelanoma skin and mucosal cancers after hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Oncol* 2006;24:1119–26.  
DOI: 10.1200/JCO.2005.02.7052.  
PMID: 16461782.
10. Williams K., Mansh M., Chin-Hong P. et al. Voriconazole-associated cutaneous malignancy: a literature review on photo-carcinogenesis in organ transplant recipients. *Clin Inf Diseases* 2014;58:997–1002.  
DOI: 10.1111/ajt.13431.  
PMID: 26372838.
11. Green A., Williams G., Neale R. et al. Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomized control trial. *Lancet* 1999;354:723–9.  
DOI: 10.1016/S0140-6736(98)12168-2.  
PMID: 18751308.
12. Lau S.C., Chen L., Cheung W.Y. Protective skin care behaviors in cancer survivors. *Curr Oncol* 2014;21:e531-e40.  
DOI: 10.3747/co.21.1893.  
PMID: 25089104.
13. Baker K.S., DeFor T.E., Burns L.J. et al. New malignancies after blood or marrow stem-cell transplantation in children and adults: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2003;21:1352–8.  
DOI: 10.1200/JCO.2003.05.108.  
PMID: 12663726
14. Cohen A., Rovelli A., Merlo D.F. et al. Risk for secondary thyroid carcinoma after hematopoietic stem – cell transplantation: an EBMT Late Effects Working Party Study. *J Clin Oncol* 2007;25:2449–54.  
DOI: 10.1200/JCO.2006.08.9276.  
PMID: 17557958.
15. Ringden O., Brazauskas R., Wang Z. et al. Second solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation using reduced-intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1777–84.  
DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.07.009.  
PMID: 25042734.
16. Curtis R.E., Metayer C., Rizzo J.D. et al. Impact of chronic GVHD therapy on the development of squamous-cell cancers after hematopoietic stem cell transplantation: an international case-control study. *Blood* 2005;105:3802–11.  
DOI: 10.1182/blood-2004-09-3411.  
PMID: 15687239.
17. Danner-Koptik K.E., Majhail N.S., Brazauskas R. et al. Second malignancies after autologous hematopoietic cell transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:363–8.  
DOI: 10.1038/bmt.2012.166.  
PMID: 22964594.
18. Bhatia S., Louie A.D., Bhatia R. et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 2001;19:464–71.  
DOI: 10.1200/JCO.2001.19.2.464.  
PMID: 11208840.
19. Ruccione K.S., Wood J.C., Sposto R. et al. Characterization of transfusion-derived iron deposition in childhood cancer survivors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:1913–9.  
DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0292.  
PMID: 24962841.
20. Rascon J., Rageliene L., Stankeviciene S. et al. An assessment of iron overload in children treated for cancer and non-malignant hematologic disorders. *Eur J Pediatr* 2014;173:1137–46.  
DOI: 10.1007/s00431-014-2295-5.  
PMID: 24659311.
21. Friedman D.L., Rovo A., Leisenring W. et al. Increased risk of breast cancer among survivors of allogeneic hematopoietic cell transplantation: a report from FHCRC and the EBMT-Late Effect Working Party. *Blood* 2008;111:939–44.  
DOI: 10.1182/blood-2007-07-099283.  
PMID: 17911386.
22. Majhail N.S., Brazauskas R., Rizzo J.D. et al. Secondary solid cancers after allogeneic hematopoietic transplantation using busulfan-cyclophosphamide conditioning. *Blood* 2011;117:316–22.  
DOI: 10.1182/blood-2010-07-294629.  
PMID: 20926773.
23. Majhail N.S., Rizzo J.D., Lee S.J. et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:348–71.  
DOI: 10.1016/j.bbmt.2011.12.519.  
PMID: 22178693.
24. Wilck M.B., Baden L.R. Vaccination after stem cell transplant: a review of recent developments and implications for current practice. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21(4):399–408.  
DOI: 10.1097/QCO.0b013e328307c7e5.  
PMID: 18594293.
25. Tedeschi S.K., Savani B.N., Jagasia M. et al. Time to consider HPV vaccination after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(8):1033–6.  
DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.03.007.  
PMID: 20302962.
26. Mannuel H.D., Mitikiri N., Hussain A. Update on testicular germ cell tumors. *Curr Opin Oncol* 2011;23(3):265–70.  
DOI: 10.1097/CCO.0b013e32834579f0.  
PMID: 21415748.
27. Schmiegelow K., Levinsen M.F., Attarbaschi A. et al. Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2469–76.  
DOI: 10.1200/JCO.2012.47.0500.  
PMID: 23690411.

# Лимфоидные неоплазии после аллогенных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток. Случай развития вторичной лимфомы Ходжкина, дифференциальная диагностика с посттрансплантационным лимфопролиферативным заболеванием

Ю.В. Скворцова<sup>1</sup>, Л.Н. Шелихова<sup>1</sup>, Н.В. Мякова<sup>1</sup>, Э.Р. Биячуев<sup>1</sup>, Д.М. Коновалов<sup>1</sup>,  
Д.С. Абрамов<sup>1</sup>, М.А. Масчан<sup>1</sup>, Е.В. Скоробогатов<sup>2</sup>, А.Г. Румянцев<sup>1</sup>, А.А. Масчан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

<sup>2</sup>ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России; Россия, 119571 Москва, Ленинский просп., 117

Контакты: Юлия Валериевна Скворцова yuscvo@mail.ru

Вторичные злокачественные заболевания являются одними из наиболее угрожающих отдаленных эффектов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В статье описана группа вторичных лимфоидных неоплазий, а также приведен редкий клинический случай развития вторичной лимфомы Ходжкина у пациента 21 года через 6 лет после аллогенной ТГСК по поводу острого миелобластного лейкоза. Данное осложнение необходимо дифференцировать с подобным лимфоме Ходжкина посттрансплантационным лимфопролиферативным заболеванием, так как подходы к их терапии и прогнозы различны. Приведены основные отличия данных патологий и способы проведения их дифференциальной диагностики.

**Ключевые слова:** аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, поздние осложнения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, вторичная лимфома Ходжкина

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-54-61

## Lymphoid neoplasms after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. The case of secondary Hodgkin's lymphoma, differential diagnosis with post-transplant lymphoproliferative disease

Yu. V. Skvortsova<sup>1</sup>, L. N. Shelichova<sup>1</sup>, N. V. Myakova<sup>1</sup>, E. R. Biyachuev<sup>1</sup>, D. M. Konovalov<sup>1</sup>,  
D. S. Abramov<sup>1</sup>, M. A. Maschan<sup>1</sup>, E. V. Skorobogatova<sup>2</sup>, A. G. Rummyantsev<sup>1</sup>, A. A. Maschan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev; Ministry of Healthcare of Russia, 1, Samory Mashela Str., Moscow, 117997, Russia;

<sup>2</sup>Russian Children Clinical Hospital; Ministry of Healthcare of Russia, 117, Leninskiy Prospect, Moscow, 119571, Russia;

Secondary malignant diseases are dangerous long-term complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This article describes the group of secondary lymphoid neoplasms and presents a rare case of secondary Hodgkin disease in a 21-year patient 6 years after HSCT due to acute myeloid leukemia. This complication should be distinguished from the Hodgkin-like posttransplant lymphoproliferative disease, because of the different therapy approaches and outcomes. We describe their main features and differential diagnostic procedures.

**Key words:** allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, long-term complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, secondary Hodgkin disease

### Обзор литературы

В настоящее время методом спасения многих пациентов со злокачественными и незлокачественными гематологическими и иммунными заболеваниями является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Улучшение выживаемости после ТГСК привело к возрастанию количества больных с отсроченными осложнениями, среди которых наиболее удручающими являются вторичные неоплазии. В плане их развития они представляют особую угрозу для детей, перенесших ТГСК. Это связано

с повышенной чувствительностью пролиферирующих клеток растущего детского организма к канцерогенам и высокой продолжительностью жизни после лечения. За последние 20 лет существенно возросло количество злокачественных заболеваний, диагностируемых после аллогенной ТГСК. В развитии вторичных неоплазий играют роль несколько факторов — цитотоксическая химиотерапия, облучение, иммуносупрессивная терапия, иммунная стимуляция, иммунный дисбаланс вследствие реакции «трансплантат против хозяина»

(РТПХ), антигенная стимуляция, активность онкогенных вирусов, генетическая предрасположенность [1].

В связи с этим созданы Международный центр исследований ТГСК (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) и Европейская группа ТГСК, которые разрабатывают скрининг вторичных неоплазий после трансплантации костного мозга и создают соответствующие руководства для врачей и пациентов [2].

Вторичные злокачественные заболевания после ТГСК разделяют на 3 группы – посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (ПТЛПЗ), лейкозы/миелодисплазии и солидные опухоли. Их кумулятивная встречаемость представлена в табл. 1 [3].

Посттрансплантационные неоплазии из лимфоидной ткани впервые были описаны в 1969 г. после трансплантации солидных органов [4]. ПТЛПЗ является частым осложнением трансплантации солидных органов с частотой встречаемости от 1 до 20 % в зависимости от вида трансплантата [5]. После аллогенной ТГСК оно встречается гораздо реже – в 0,5–1,8 % случаев [6]. Изначально полагали, что это состояние исключительно злокачественное, однако в настоящее время признано, что оно включает в себя группу нарушений, варьирующих от доброкачественной поликлональной гиперплазии до злокачественных клональных пролифераций [7–11]. Исторически считается, что ПТЛПЗ ассоциировано с неконтролируемым размножением В-лимфоцитов, трансформированных

вирусом Эпштейна–Барр (ЭБВ). Однако встречаются и ЭБВ-негативные ПТЛПЗ [12]. Описаны случаи ПТЛПЗ после трансплантации пуповинной крови [13] и аллогенных ТГСК с немиелоаблативным кондиционированием [14, 15].

Чаще всего ПТЛПЗ развивается в первые 6 мес (в среднем на 70–90-е дни) после аллогенной ТГСК, так как в этот период еще не происходит реконституции ЭБВ-специфичных цитотоксических лимфоцитов [16]. Описаны случаи ПТЛПЗ и на сроках 1 нед, и через 9 лет от момента ТГСК. В последние годы возрастает количество поздних случаев ПТЛПЗ [17], что ассоциировано, как правило, с низким уровнем CD4-лимфоцитов [18].

Клиника ПТЛПЗ очень вариабельна – от ограниченного поражения лимфоидной ткани до диффузного процесса, имитирующего фульминантный септический синдром [19]. Заболевание может протекать как ОРВИ, а иногда сразу проявляется поражением функции какого-либо органа. Многие случаи осложнены параллельно протекающей цитомегаловирусной инфекцией или инвазивным аспергиллезом. Любой пациент после ТГСК, у которого отмечаются лимфаденопатия, объемные образования, лихорадка, необъяснимые боли, потеря массы тела или дисфункция органов, должен быть проверен на наличие ПТЛПЗ [20]. Желательно подтверждение диагноза по обнаружению вируса не только в крови, но и в биоптатах пораженных тканей при гистологическом исследовании. Для подтверждения диагноза используются иммунофенотипирование, иммуногистохимическое (ИГХ) исследование, молекулярные методы – *in situ* гибридизация ранней дезоксирибонуклеиновой кислоты ЭБВ (EBER) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) на ЭБВ. Заболевание должно быть четко доказано, так как способы лечения (например, редукция иммуносупрессии) могут привести к тяжелым осложнениям у пациента. Еще 10 лет назад ранняя смертность от ПТЛПЗ после ТГСК составляла 90 %, в настоящее время вследствие активного проведения адоптивной клеточной терапии общая 5-летняя выживаемость достигает 40–60 % [21]. Большинство летальных исходов ассоциировано с прогрессией заболевания, однако 40 % случаев составляют смерти от инфекций и токсичности терапии. Неблагоприятный прогноз ассоциирован со старшим возрастом пациента, продвинутыми стадиями заболевания, плохим соматическим статусом, высоким уровнем лактатдегидрогеназы, поражением центральной нервной системы, гипоальбуминемией.

При ранних ПТЛПЗ (первый год после ТГСК) ЭБВ обнаруживается более чем в 90 % В-клеток. С течением времени, после года от момента ТГСК, пропорция выявляемости ЭБВ постепенно снижается, достигая в среднем 21–32 % случаев [22]. В последние годы возрастает количество ЭБВ-негативных ПТЛПЗ: с 10 % (90-е годы) до 48 % (2008–2013 гг.) [23].

**Таблица 1.** Кумулятивная встречаемость вторичных злокачественных заболеваний после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) (адаптировано из [3])

**Table 1.** Cumulative incidence of secondary malignant diseases after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (adapted from [3])

Заболевание Disease	Кумулятивная встречаемость Cumulative incidence
Солидные опухоли Solid tumors	1,2–1,6 % к 5 годам после ТГСК, 2,2–6,1 % к 10 годам, 3,8–14,9 % спустя 15 лет 1.2–1.6 % – 5 years after HSCT, 2.2–6.1 % – 10 years after HSCT, 3.8–14.9 % – 15 years after HSCT
Посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание Post-transplant lymphoproliferative disease	0,6–1,4 % (75 % в течение первого года) после аллогенной ТГСК. Редко после аутологичной ТГСК 0.6–1.4 % after allogeneic HSCT (75 % within the first year). Rarely after autologous HSCT
Миелодиспластический синдром/лейкозы Myelodysplastic syndrome/leukemia	5–15 % после аутологичной ТГСК. Редко после аллогенной ТГСК 5–15 % after autologous HSCT. Rarely after allogeneic HSCT

Тем не менее рекомендуется оценивать наличие ЭБВ в каждом образце биоптатов (используется метод *in situ* гибридизации), так как ЭБВ-статус определяет терапевтические подходы (например, ЭБВ-позитивность позволяет использовать антитела к CD20 и ЭБВ-специфичные донорские лимфоциты). ИГХ-исследование на белки вируса может помочь с определением ЭБВ в латентном состоянии или на стадии лизиса (экспрессия белка ZEBRA – BamHI-Z-кодированный активатор репликации ЭБВ).

В 2001 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала классификацию ПТЛПЗ, которая применяется и в настоящее время (в 2008 г. была дополнена гистологическими критериями). Согласно этой классификации среди ПТЛПЗ выделяют: 1) ранние нарушения, такие как реактивная лимфоплазматическая гиперплазия и синдром, подобный инфекционному мононуклеозу, 2) полиморфное ПТЛПЗ, 3) мономорфное ПТЛПЗ и 4) ПТЛПЗ, подобное лимфоме Ходжкина (табл. 2) [24].

В ряде случаев полиморфные ПТЛПЗ трудно дифференцировать от нарушений, подобных инфекционному мононуклеозу или лимфоме Ходжкина [25]. Обычно клеточный инфильтрат патологического материала состоит из лимфоцитов, гистиоцитов и плазматических клеток. Трансформированные В-бласты, из которых развиваются эти клетки, экспрессируют CD20 и CD30 и не имеют экспрессии CD15. Мономорфные ПТЛПЗ отвечают гистологическим критериям лимфомы, преимущественно В-фенотипа (сре-

ди лимфом наиболее часто встречаются В-клеточная, диффузная крупноклеточная и плазмобластная), но описаны и Т-клеточные варианты (как гепатолиенальная Т-клеточная лимфома), и комбинированные виды лимфом. Самым трудным для диагностики является последний вариант, так как данный вид ПТЛПЗ очень сложно отличить от классической лимфомы Ходжкина, а это разные нозологические единицы, требующие неодинаковых методов терапии.

Случаи ПТЛПЗ, подобного лимфоме Ходжкина, встречаются очень редко, хотя и описаны [26–28]. Встречаемость данного состояния составляет 1,8–3,4 % от ПТЛПЗ у детей [29]. Наличие вариаций гистологической картины и клинических проявлений до сих пор вызывает споры, является ли эта патология формой лимфомы Ходжкина либо В-клеточным ПТЛПЗ. При анализе каждого случая желательно использовать данные иммунофенотипирования, ЭБВ-статуса, клональности и оценивать клинический ответ на проводимую терапию. Описана также уникальная эволюция из подобного лимфоме Ходжкина ПТЛПЗ в истинную лимфому Ходжкина.

Чтобы провести дифференциальную диагностику, используют следующие критерии. Плеоморфные В-клетки или опухолевые клетки при ПТЛПЗ экспрессируют на своей поверхности CD20 и/или CD79a, а также CD45 и CD30, но обычно негативны в отношении CD15 и в них также меньше митозов. Кроме того, и эти опухолевые клетки, и окружающие лимфоциты позитивны в отношении ранней рибонуклеиновой

**Таблица 2.** Классификация посттрансплантационных лимфопролиферативных заболеваний (ПТЛПЗ) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (адаптировано из [24])

**Table 2.** Classification of post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) World health organization (adapted from [24])

Вид Nosology	Клональность Clonality	Характеристики Characteristics
Ранние нарушения: а) реактивная лимфоплазматическая гиперплазия, б) нарушения, подобные инфекционному мононуклеозу Early disorders: а) Reactive lymphoplasmocytic hyperplasia б) Disorders similar to infectious mononucleosis	Поликлональные Polyclonal	Обычно регрессируют спонтанно или после редукции иммуносупрессии Usually regresses spontaneously or after reduction of immunosuppression
Полиморфные ПТЛПЗ Polymorphic PTLD	В большинстве поликлональные In most polyclonal	Вариабельный ответ на редукцию иммуносупрессии Variable response to the reduction of immunosuppression
Мономорфные ПТЛПЗ Monomorphic PTLD	Моноклональные Monoclonal	Должны быть классифицированы согласно классификации неходжкинских лимфом ВОЗ 2008 г. Should be classified according to the WHO-classification of NHL, 2008 year
Лимфома Ходжкина и ПТЛПЗ, подобное лимфоме Ходжкина Hodgkin Lymphoma and Hodgkin-like PTLD	Моноклональные Monoclonal	Похожи на лимфому Ходжкина Similar to Hodgkin's lymphoma

кислоты ЭБВ (EBER1). При лимфоме Ходжкина в клеточном субстрате из плазмочитов, эозинофилов и гистиоцитов должны обязательно присутствовать клетки Ходжкина и Рид–Штернберга. Эти клетки показывают высокую экспрессию CD30 и CD15 (при этом отсутствует экспрессия CD20 и очень слабо выражена экспрессия CD45 и PAX5 [30]), и только эти опухолевые клетки позитивны в отношении EBER1. Определение паттерна белков ЭБВ служит подспорьем. В отличие от классической лимфомы Ходжкина, где ЭБВ ограничен присутствием в развитых клетках Ходжкина и Рид–Штернберга и имеет промежуточную латентность – II тип латентности ЭБВ (опухолевые клетки EBER1 и LMP1 позитивны, EBNA2 негативны), в ПТЛПЗ, подобных лимфоме Ходжкина, ЭБВ может быть обнаружен в широком спектре В-клеток, при этом заболеванию характерен III тип латентности (опухолевые клетки EBER1, LMP1 и EBNA2 позитивны) [31]. Также необходима корреляция с клинической картиной: например, при лимфоме Ходжкина, в отличие от ПТЛПЗ, практически не поражаются лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками. В случае ПТЛПЗ, подобного лимфоме Ходжкина, презентация более агрессивна, а прогноз в большинстве случаев неблагоприятный [28, 31, 32]. Таким образом, иммунофенотипически и биологически это два совершенно разных процесса лимфопрлиферации, поэтому требуются и различные подходы в терапии.

Четыре категории ПТЛПЗ бывает трудно разделить вследствие возможного «перекреста» презентации, а иногда в разных частях тела может протекать патологический процесс с различной гистологией. Поэтому, если по данным позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) обнаруживают поражение более обширное, чем предполагалось, следует выполнять новую биопсию подозрительных участков.

Для стадирования ПТЛПЗ рекомендуется применять принцип стадирования неходжкинских лимфом с предварительным проведением компьютерной томографии (КТ) грудной клетки, брюшной полости и малого таза и определением уровня лактатдегидрогеназы в сыворотке крови.

Основным способом мониторинга заболевания до его клинических проявлений выступает регулярное количественное определение ЭБВ методом ПЦР в сыворотке крови, но это не заменяет необходимости проведения биопсии для адекватной диагностики.

«Золотым стандартом» для оценки степени поражения и ответа на лечение является ПЭТ: F-FDG (fluorine-18<sup>02</sup>-флюоро-2-deoxyglucose) PET/CT – (флюорин-18<sup>02</sup>-флюоро-2-дезоксиглюкоза) ПЭТ/КТ. Доказана исключительная важность проведения ПЭТ для определения срока окончания терапии, особенно для пациентов с частичным ответом на лечение [33].

Рекомендации по лечению ПТЛПЗ были созданы на основе классификации ВОЗ [24]. Первый тип, или ранние поликлональные нарушения, такие как ре-

активная лимфоплазмочитарная гиперплазия или синдромы, подобные инфекционному мононуклеозу, имеют склонность к самоограничению и обычно не требуют вмешательства, хотя и при этом типе ПТЛПЗ рекомендуется редукция иммуносупрессивной терапии. Второй тип поликлональных нарушений обычно требует редукции иммуносупрессии, но ответ варьируется. Третий тип, или лимфома, подвергается лечению в случае редукции иммуносупрессии и применения химиотерапии. Четвертый тип нуждается в агрессивном подходе в лечении.

С целью предупреждения развития ПТЛПЗ у пациентов группы высокого риска (Т-клеточная деплеция, ЭБВ-серопозитивный донор и ЭБВ-серонегативный реципиент, ожидаемая РТПХ) наиболее эффективным является удаление В-клеток из трансплантата с помощью CD19-деплеции или же применения анти-CD20-моноклональных антител (ритуксимаба). В дальнейшем регулярно используют мониторинг уровня ЭБВ в крови методом ПЦР до момента достижения иммунорекогнституции. При нарастании виремии допустимо проведение превентивной терапии ритуксимабом. При доказанном ПТЛПЗ лечение необходимо начинать быстро, оно должно соответствовать типу и гистологической картине заболевания [25]. Основные виды терапии ПТЛПЗ включают в себя редукцию иммуносупрессивной терапии, применение моноклональных антител (ритуксимаб), инфузии донорских лимфоцитов (предпочтительно ЭБВ-специфичные цитотоксические лимфоциты), блокирование цитокинов (например, использование антител к интерлейкину-6), высоких доз иммуноглобулинов, а также полихимиотерапию, реже лучевую терапию и оперативное лечение.

Мономорфные виды ПТЛПЗ часто протекают агрессивно, в их лечении применяют протоколы терапии неходжкинских лимфом. Подобное лимфоме Ходжкина ПТЛПЗ также отличается высокой злокачественностью и быстротой течения, в лечении необходима комбинация ритуксимаба и полихимиотерапии с клеточной терапией ЭБВ-специфичными цитотоксическими Т-лимфоцитами. В противоположность данному заболеванию вторичная лимфома Ходжкина имеет более благоприятный прогноз и подвергается лечению согласно классическим схемам.

В литературе описаны единичные случаи развития подобного лимфоме Ходжкина ПТЛПЗ, или вторичной лимфомы Ходжкина, после аллогенной ТГСК. В нашем центре выявлен один пациент с данным редким осложнением.

#### **Клинический случай**

*Пациент В. заболел острым миелобластным лейкозом (М0-вариант, рефрактерное течение) в возрасте 14 лет, получал терапию по локальному протоколу с включением стандартных препаратов по месту жительства. В связи с высоким риском рецидива в 15 лет мальчику была проведена аллогенная трансплантация костного мозга от бра-*

та (HLA-совместимость — 10/10, совместимы по группе крови A (II) Rh+, анти-СМV-IgG- и анти-ЭБВ-IgG-положительные донор и реципиент) в отделении трансплантации костного мозга ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России (Москва). Режим кондиционирования включал в себя бусульфан 16 мг/кг, флударабин 150 мг/м<sup>2</sup>, мельфалан 140 мг/м<sup>2</sup> (указаны суммарные дозы). Клеточность трансплантата составила: NC —  $3,8 \times 10^8$ /кг, CD34 —  $7 \times 10^6$ /кг. Профилактика РТПХ проводилась только циклоспорином А в дозе 1 мг/кг в связи с высоким риском развития рецидива. Приживление трансплантата зарегистрировано на +15 день. Ранний посттрансплантационный период осложнился развитием мукозита III степени, циклоспорин- и стероид-ассоциированной артериальной гипертензией, энтеритом легкой степени, синдромом гипокоагуляции, синдромом приживления. Отмечалось также течение острой РТПХ II стадии с поражением кожи и печени. Получал терапию кортикостероидами в дозе 2 мг/кг/сут, циклоспорином с конверсией на такролимус. Ответ был достигнут, кортикостероиды постепенно отменены. Прием такролимуса прекращен через 3 мес от момента ТГСК. Длительно наблюдалась цитопения, требовавшая заместительных трансфузий, стимуляции гранулоцитопоза. Через 4 мес от момента ТГСК гемопоэз восстановился, сохранялся глубокий иммунодефицит. Через 5 мес от момента ТГСК и 1,5 мес от отмены такролимуса у пациента появилась пятнистая сыпь на коже конечностей, туловища, с незначительным кожным зудом. В анализах отмечены эозинофилия до 52 %, 10-кратный рост трансаминаз. Исследование крови методом ПЦР на вирусы гепатитов В, С, D, G, цитомегаловирус, герпес 6-го типа, ЭБВ дало негативный результат. Предполагается течение острой РТПХ с поражением кожных покровов и печени. Возобновлен прием такролимуса, на фоне которого отмечено быстрое снижение трансаминаз, полное исчезновение кожной сыпи, параллельно в гемограмме снижение эозинофилии с последующей нормализацией уровня эозинофилов, восстановление уровня тромбоцитов. В дальнейшем РТПХ не возобновлялась, выявляли только лейкоплакии на слизистых полости рта, такролимус был отменен через 5 мес. Мальчика беспокоили боли в ногах, после инфузии бисфосфонатов и использования миокальцика боли постепенно прошли.

При контрольных обследованиях состояние оставалось стабильным, сохранялся длительно вторичный Т-клеточный иммунодефицит с низким уровнем заболеваемости инфекциями.

Пациент выполнил график вакцинации. Из отдаленных эффектов наблюдались: вторичный полиневропатический синдром, вторичный селективный дефицит Т-хелперов (!), в гормональном статусе — повышение уровня фолликулостимулирующего гормона.

Через 2,5 года от момента ТГСК у юноши выявлены деструктивные изменения латеральных мыщелков дистальных метаэпифизов бедренной кости. В Австрии (Вена) проведено 2 поэтапных оперативных вмешатель-

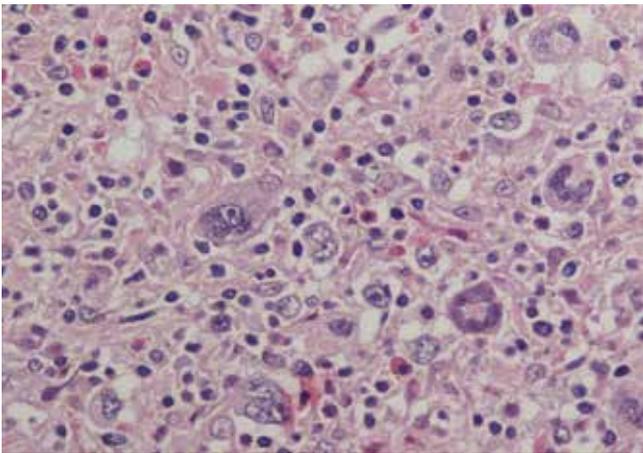
ства по поводу асептических некрозов мыщелков дистальных метаэпифизов бедренных костей с 2 сторон.

В дальнейшем пациент какое-то время не проходил контрольные обследования. Через 6 лет от момента проведения аллогенной ТГСК юноша отметил появление геморрагических высыпаний на коже нижних конечностей, обратился к гематологу по месту жительства. При обследовании выявлена тромбоцитопения до  $3 \times 10^9$ /л, направлен в ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы». В миелограмме выявлено отсутствие мегакариоцитов без другой патологии (ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). При цитогенетическом исследовании костного мозга (ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, ННПЦ ДГОИ) получен нормальный мужской кариотип, при исследовании методом FISH (fluorescence in situ hybridization) делеции 17p, перестроек гена MLL (c-human mpl-gene — гена рецептора к тромбопоэтину) не обнаружено. Состояние расценено как иммунная тромбоцитопения. На протяжении 4 дней осуществлена пульс-терапия дексаметазоном в дозе 40 мг/сут, что не привело к росту тромбоцитов. Далее пациенту проводили терапию высокими дозами иммуноглобулинов с незначительным клиническим эффектом. Параллельно получено заключение результатов трепанобиопсии: умеренно гипоклеточный костный мозг, мегакариоциты в увеличенном количестве, в субкортикальных костномозговых полостях среди разрастания фиброзной ткани определяется рыхлый пролиферат из мелких лимфоидных клеток с примесью плазмоцитов, гистиоцитов, эозинофильных гранулоцитов, макрофагов, среди которого определяются крупные лимфоидные клетки с морфологией клеток Ходжскина, Березовского—Штернберга, интерстициально рассеяны мелкие лимфоидные и зрелые плазматические клетки — разрозненно и по 4—5 клеток. Таким образом, морфологическая картина в наибольшей степени характеризовала поражение костного мозга при лимфоме Ходжскина. Диагноз лимфомы Ходжскина был также подтвержден на основании гистологического исследования биоптата лимфатического узла (ННПЦ ДГОИ). Структура лимфатического узла нарушена, отмечается замещение лимфоидной ткани полиморфноклеточным инфильтратом (рис. 1), среди которого отчетливо видны классические клетки Рид—Штернберга и Ходжскина (рис. 2 и 3). При ИГХ-исследовании выявлено, что опухолевые клетки экспрессируют CD30 (мембранная, цитоплазматическая, dot-like реакция), CD15 (мембранная, цитоплазматическая, dot-like реакция), PAX5 (слабая ядерная экспрессия по сравнению с В-клетками (CD20<sup>+</sup>) реактивного микроокружения). Опухолевые клетки негативны при реакции с CD20<sup>-</sup>. Среди реактивного микроокружения присутствуют мелкие лимфоидные Т<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>) и В<sup>-</sup> (CD20<sup>-</sup>) клетки. Заключение: морфологическая картина и иммунофенотип соответствуют лимфоме Ходжскина, вариант — нодулярный склероз, NS I типа, CD20<sup>-</sup>. При изучении ЭБВ-статуса в биоптате (к сожалению, уже после окон-



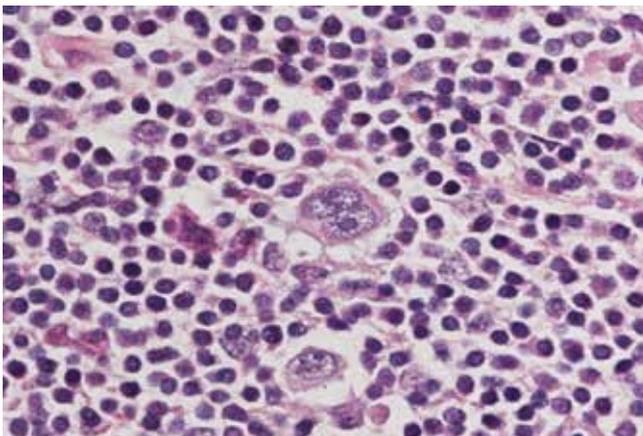
**Рис. 1.** Обзорный снимок лимфатического узла: утрата топографического строения лимфоидной ткани, замещение полиморфноклеточным инфильтратом; окраска гематоксилин-эозином;  $\times 40$

**Fig. 1.** Review the lymph node: the loss of lymphoid tissue topographical structure, substitution by polymorphic cell infiltrate; hematoxylin-eosin stain;  $\times 40$



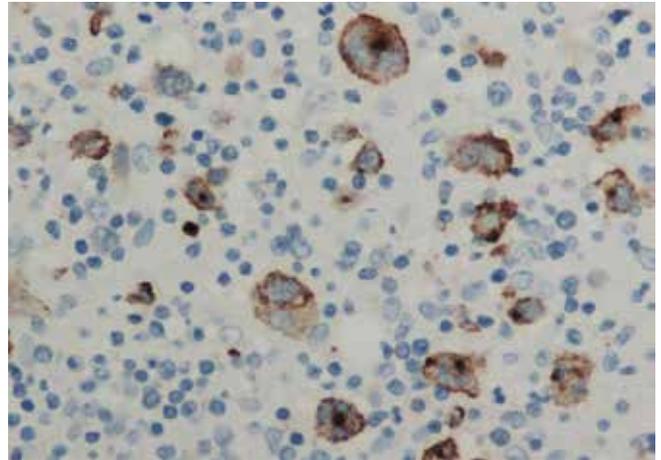
**Рис. 2.** Типичные и атипичные клетки Рид–Штернберга и Ходжкина в полиморфноклеточном инфильтрате. Окраска гематоксилин-эозином;  $\times 400$

**Fig. 2.** Typical and atypical Reed–Sternberg and Hodgkin cells in a polymorphic cell infiltrate; hematoxylin-eosin stain;  $\times 400$



**Рис. 3.** Типичная клетка Рид–Штернберга, окраска гематоксилин-эозином;  $\times 600$

**Fig. 3.** A typical Reed–Sternberg cell; hematoxylin-eosin stain;  $\times 600$



**Рис. 4.** Экспрессия LMP1 на клетках Ходжкина и Рид–Штернберга. Иммуногистохимическая реакция;  $\times 400$

**Fig. 4.** LMP1 expression on Hodgkin and Reed–Sternberg cells. Immunohistochemical reaction;  $\times 400$

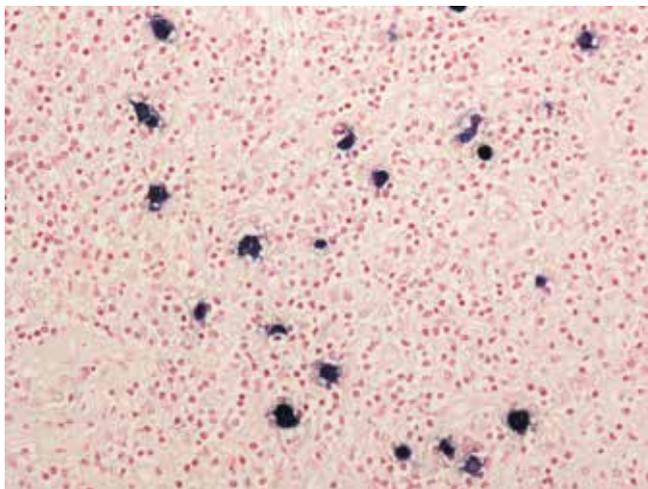


**Рис. 5.** Экспрессия EBER1 на опухолевых клетках, гибридизация in situ. Зонд CONFIRM EBER (Ventana);  $\times 100$

**Fig. 5.** EBER1 expression on tumor cells, hybridization in situ. Probe CONFIRM EBER (Ventana);  $\times 100$

чания терапии) в отделении патологической анатомии ННПЦ ДГОИ выявлена экспрессия белка LMP1 (латентный мембранный протеин) на клетках Рид–Штернберга (рис. 4), присутствие в патологических клетках белка EBER (рис. 5 и 6), отсутствие белка ZEBRA, получены данные о промежуточной латентности вируса (II тип) в клетках Березовского–Штернберга, отсутствии его в окружающих клетках.

На основании данных обследований (биопсии надключичного ЛУ, ИГХ, УЗИ брюшной полости, периферических ЛУ, КТ органов грудной клетки, брюшной полости, ПЭТ) поставлен диагноз: «Лимфома Ходжкина, вариант нодулярный склероз, NS I типа с умеренно выраженной эозинофильной инфильтрацией с поражением медиастинальных лимфатических узлов, забрюшинных и подвздошных лимфатических узлов, селезенки, грудины и позвонков. IVБ стадия». Больной был отнесен к неблагоприятной прогностической группе по классификации



**Рис. 6.** Экспрессия EBER1 на опухолевых клетках, гибридизация *in situ*. Зонд CONFIRM EBER (Ventana);  $\times 200$   
**Fig. 6.** EBER1 expression on tumor cells, hybridization *in situ*. Probe CONFIRM EBER (Ventana);  $\times 200$

германской группы по изучению лимфомы Ходжкина (стадия IVB, неблагоприятные прогностические факторы: В-симптомы + поражение более 3 зон лимфатических узлов, костей), показано проведение терапии для пациентов с неблагоприятным прогнозом – ВЕАСОРР-14. Получил 8 курсов химиотерапии по схеме ВЕАСОРР-14. Первый курс осложнился развитием гнойного подчелюстного лимфаденита, в целом лечение переносил удовлетворительно, но возникло усугубление токсической сенсорной полинейропатии.

После полученных 6 курсов ВЕАСОРР-14 ПЭТ-исследование данных о метаболической активности лимфопролиферативной ткани не выявило. Таким образом, у пациента достигнута полная метаболическая ремиссия.

В дальнейшем юноша наблюдался у гематолога по месту жительства. В настоящее время, спустя 1,5 года после окончания терапии лимфомы Ходжкина, состояние удовлетворительное, беспокоят проявления нейропатии нижних конечностей; ведет активный образ жизни, состоит в гражданском браке.

### Обсуждение

Данный клинический случай позволяет провести сложную дифференциальную диагностику между ПТЛПЗ, подобным лимфоме Ходжкина, и настоящей лимфомой Ходжкина. Это имеет большое значение в плане как терапии, так и прогноза жизни пациента. Как мы

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

видим, заболевание развилось спустя 6 лет от момента ТГСК на фоне вторичного селективного дефицита Т-лимфоцитов-хелперов (CD4<sup>+</sup>). Манифестация данной лимфоидной неоплазии носила неординарный характер, не было первичного очага поражения, процесс проявил себя уже на IV стадии при поражении костного мозга. У юноши не отмечалось поражения лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками. Не было также зарегистрировано ЭБВ-виремии на момент заболевания. По данным ИГХ-исследования биоптата лимфатического узла опухолевые клетки экспрессируют CD30 (мембранная, цитоплазматическая, dot-like реакция), CD15 (мембранная, цитоплазматическая, dot-like реакция), PAX5 (слабая ядерная экспрессия по сравнению с В-клетками (CD20<sup>+</sup>) реактивного микроокружения). Опухолевые клетки негативны при реакции с CD20<sup>-</sup>. Среди реактивного микроокружения присутствуют мелкие лимфоидные Т<sup>-</sup> (CD3<sup>+</sup>) и В<sup>-</sup> (CD20<sup>+</sup>) клетки. При определении ЭБВ в биоптате результат характерен для истинной лимфомы Ходжкина, ЭБВ с промежуточным типом латентности обнаружен только в опухолевых клетках. Таким образом, морфологическая картина и иммунофенотип соответствовали лимфоме Ходжкина (вариант нодулярный склероз, NS I типа, CD20<sup>-</sup>). Не было выявлено признаков, типичных для ПТЛПЗ 4-го вида (трансформация из В-бластов, которые экспрессируют CD20 и CD30 и не имеют экспрессии CD15). Принадлежность данного процесса к лимфоме Ходжкина можно также определить косвенно по клиническому течению заболевания, переносимости и эффективности проводимой терапии (небольшое количество побочных эффектов, своевременный ПЭТ-ответ).

### Заключение

Данное клиническое описание иллюстрирует широкое многообразие и вариабельную клиническую презентацию злокачественных заболеваний после аллогенных ТГСК. Очевидной представляется необходимость проведения тщательного мониторинга пациентов после ТГСК, в том числе и на поздних сроках, так как данные осложнения не ограничены во времени. При диагностике процесса крайне важно всестороннее исследование патологического субстрата с использованием комплекса методов – иммуногистохимии, молекулярной диагностики, современных способов визуализации – с целью постановки точного диагноза и формирования четкой стратегии лечения со своевременной и адекватной оценкой ответа на проводимую терапию.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Deeg H.J., Socie G. Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers. *Blood* 1998;91:1833–44. PMID: 9490664.
2. Inamoto Y., Shah N.N., Savani B.N. et al. Secondary solid cancer screening following hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(8):1013–23.

- DOI: 10.1038/bmt.2015.63.  
PMID: 25822223.
3. Majhail N.S. Old and new cancers after hematopoietic-cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008;142–9.  
DOI: 10.1182/asheducation-2008.1.142.  
PMID: 19074072.
  4. Penn I., Hammon W., Bretschneider L. et al. Malignant lymphomas in transplantation patients. *Transplant Proc* 1969;1:106–12. PMID: 4944206.
  5. Cockfield S.M. Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transpl Infect Dis* 2001;3(2):70–8. PMID: 1139597247.
  6. Baker K.S., DeFor T.E., Burns L.J. et al. New malignancies after blood or marrow stem-cell transplantation in children and adults: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2003;21(7):1352–8. Erratum in: *J Clin Oncol* 2003;21(16):3181. DOI: 10.1200/JCO.2003.05.108. PMID: 12663726.
  7. Orazi A., Hromas R.A., Neiman R.S. et al. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. *Am J Clin Pathol* 1997;107: 419–29. PMID: 9124210.
  8. Hoover R.N. Lymphoma risks in populations with altered immunity — a search for mechanism. *Cancer Res* 1992;52:5477s. PMID: 1394157.
  9. Cohen J.I. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medicine (Baltimore)* 1991;70:137–60. PMID: 1848644.
  10. Liebowitz D. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med* 1998;338:1413–21. DOI: 10.1056/NEJM199805143382003. PMID: 9580648.
  11. Nalesnik M.A., Makowka L., Starzl T.E. The diagnosis and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Curr Probl Surg* 1988;25:367–72. PMID: 3063441.
  12. Leblond V., Davi F., Charlotte F. et al. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol* 1998;16(6):2052–9. PMID: 9626203.
  13. Gong J.Z., Bayerl M.G., Sandhaus L.M. et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder after umbilical cord blood transplantation in children. *Am J Surg Pathol* 2006;30(3):328–36. DOI: 10.1097/01.pas.0000188030.63706.e7. PMID: 16538052.
  14. Brunstein C.G., Weisdorf D.J., DeFor T. et al. Marked increased risk of Epstein-Barr virus-related complications with the addition of antithymocyte globulin to a nonmyeloablative conditioning prior to unrelated umbilical cord blood transplantation. *Blood* 2006;108(8):2874–80. DOI: 10.1182/blood-2006-03-011791. PMID: 16804113.
  15. Snyder M.J., Stenzel T.T., Buckley P.J. et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Am J Surg Pathol* 2004;28(6):794–800. PMID: 151666725.
  16. Bollard C.M., Rooney C.M., Heslop H.E. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9(9):510–29. Epub 2012 Jul 17. Review. DOI: 10.1038/nrclinonc.2012.111. PMID: 22801669.
  17. Rowlings P.A., Curtis R.E., Passweg J.R. et al. Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1999;17(10):3122–7. PMID: 10506608.
  18. Grulich A.E., Van Leeuwen M.T., Falster M.O. et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007;370(9581):59–67. Review. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61050-2. PMID: 17617273.
  19. Gottschalk S., Rooney C.M., Heslop H.E. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med.*, 2005;56:29–44. DOI: 10.1146/annurev.med.56.082103.104727. PMID: 15660500.
  20. Loren A.W., Porter D.L., Stadtmauer E.A. et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(3):145–55. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703806. PMID: 12621474.
  21. Dierickx D., Tousseyn T., Sagaert X. et al. Single-center analysis of biopsy-confirmed posttransplant lymphoproliferative disorder: incidence, clinicopathological characteristics and prognostic factors. *Leuk Lymphoma* 2013;54(11):2433–40. DOI: 10.3109/10428194.2013.780655. PMID: 23442063.
  22. Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders after transplantation. *Am J Transplant* 2004;4(Suppl.10):59–65. DOI: 10.1111/j.1600-6135.2004.00728.x. PMID: 15504214.
  23. Luskin M.R., Heil D.S., Tan K.S. et al. The Impact of EBV Status on Characteristics and Outcomes of Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder. *Am J Transplant* 2015;15(10):2665–73. DOI: 10.1111/ajt.13324. PMID: 25988622.
  24. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H. et al. Pathology and genetics of tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues. In: *World Health Organization Classification of Tumours*, vol. 3. Lyon, France: IARC Press, 2001. P. 264–9.
  25. Dierickx D., Tousseyn T., Gheysens O. How I treat posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood* 2015;126(20):2274–83. DOI: 10.1182/blood-2015-05-615872. PMID: 26384356.
  26. Semakula B., Rittenbach J.V., Wang J. Hodgkin lymphoma-like posttransplantation lymphoproliferative disorder. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(4):558–60. DOI: 10.1043/1543-2165(2006)130[558:HL-PLD]2.0.CO;2. PMID: 16594752.
  27. Pitman S.D., Huang Q., Zuppan C.W. et al. Hodgkin lymphoma-like posttransplant lymphoproliferative disorder (HL-like PTLD) simulates monomorphic B-cell PTLD both clinically and pathologically. *Am J Surg Pathol* 2006;30(4):470–6. PMID: 16625093.
  28. Rohr J.C., Wagner H.J., Lauten M. et al. Differentiation of EBV-induced post-transplant Hodgkin lymphoma from Hodgkin-like post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* 2008;12(4):426–31. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2007.00816.x. PMID: 18466428.
  29. Ranganathan S., Webber S., Ahuja S. et al. Hodgkin-like posttransplant lymphoproliferative disorder in children: does it differ from posttransplant Hodgkin lymphoma? *Pediatr Dev Pathol* 2004;7(4):348–60. DOI: 10.1007/s10024-003-1115-0. PMID: 14564542.
  30. Tsao L., Hsi E.D. The clinicopathologic spectrum of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(8):1209–18. DOI: 10.1043/1543-2165(2007)131[1209:TC-SOPL]2.0.CO;2. PMID: 17683183.
  31. Krishnamurthy S., Hassan A., Frater J.L. et al. Pathologic and clinical features of Hodgkin lymphoma-like posttransplant lymphoproliferative disease. *Int J Surg Pathol* 2010;18(4):278–85. Erratum in: *Int J Surg Pathol* 2010;18(5):444. DOI: 10.1177/1066896909338597. PMID: 19578050.
  32. Pitman S.D., Huang Q., Zuppan C.W. et al. Hodgkin lymphoma-like posttransplant lymphoproliferative disorder (HL-like PTLD) simulates monomorphic B-cell PTLD both clinically and pathologically. *Am J Surg Pathol* 2006;30(4):470–6. PMID: 16625093.
  33. Takehana C.S., Twist C.J., Mosci C. et al. (18)F-FDG PET/CT in the management of patients with post-transplant lymphoproliferative disorder. *Nucl Med Commun* 2014;35(3):276–81. DOI: 10.1097/MNM.000000000000050. PMID: 24296883.

# Исследование минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитофлуориметрии у больных множественной миеломой после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева, Ю.О. Давыдова, М.В. Соловьев, Н.М. Капранов,  
Л.А. Кузьмина, Е.О. Грибанова, Т.В. Гапонова, В.Г. Савченко

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Ирина Владимировна Гальцева [irinagaltseva@gmail.com](mailto:irinagaltseva@gmail.com)

В связи с внедрением высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) в схемы лечения множественной миеломы (ММ) увеличилась частота достижения полной ремиссии, а также общая и безрецидивная выживаемость. Однако количество рецидивов ММ остается высоким, что связано с персистенцией остаточных опухолевых клеток, т.е. с наличием минимальной остаточной болезни (МОБ). Одним из методов диагностики МОБ является многоцветная проточная цитофлуориметрия (МПЦ), позволяющая определять миеломные плазматические клетки (ПК) в костном мозге по их аномально экспрессирующимся антигенам.

**Целью** нашего исследования было определение МОБ методом МПЦ до и после аутоТГСК, частоты достижения МОБ-негативного статуса в период полной ремиссии (ПР) на +100-й день после аутоТГСК, анализ частоты встречаемости аномальной экспрессии ряда антигенов на миеломных клетках. В исследование были включены 40 пациентов с ММ в ПР на +100-й день после аутоТГСК. Показано, что наиболее часто встречающимися aberrациями ПК были: аномальное отсутствие CD19 и CD27, сниженная экспрессия CD38 и аномальное наличие CD56. Было установлено достоверное снижение доли аномальных ПК после аутоТГСК: еще 20 % пациентов приобрели МОБ-негативный статус, у 10 % отмечено снижение количества аномальных ПК в среднем на порядок. Данные анализа вероятности развития иммунохимического рецидива показали, что самый плохой прогноз был у пациентов с МОБ-позитивным статусом до и после проведения аутоТГСК. В ходе мониторинга МОБ в течение 3–18 мес были выявлены иммунофенотипические рецидивы с последующим развитием рецидива иммунохимического. Исследование МОБ в динамике является более информативным, чем исследование на одном этапе терапии, что может способствовать выбору более адекватной тактики лечения множественной миеломы в каждом конкретном случае.

**Ключевые слова:** множественная миелома, минимальная остаточная болезнь, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-62-69

## Study of minimal residual disease by multicolor flow cytometry in multiple myeloma after autologous hematopoietic stem cell transplantation

I.V. Galtseva, L.P. Mendeleeva, Y.O. Davydova, M.V. Solov'ev, N.M. Kapranov,  
L.A. Kuzmina, E.O. Gribanova, T.V. Gaponova, V.G. Savchenko

Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Noviy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

The frequency of achieving complete remission, as well as overall and disease-free survival, in multiple myeloma (MM) had increased due to introduction in MM treatment regimens of high-dose chemotherapy with following autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT). However the number of relapses remains high, caused by persistence of residual tumor cells, i.e., the presence of minimal residual disease (MRD). One of the methods for MRD study is multicolor flow cytometry (MFC) where abnormal expression of surface antigens on myeloma plasma cells (PC) is determined. The aim of our study was to investigate the MRD by MFC before and after ASCT, the frequency of MRD-negative status achievement in complete remission (CR) patients at +100 days after ASCT and the frequency of abnormal expressed antigens on myeloma plasma cells. The study included 40 MM patients in CR at +100 days after ASCT and showed that the most common aberrations of PC were: abnormal absence of CD19 and/or CD27, decreased expression of CD38 and abnormal presence of CD56. The proportion of myeloma PCs from all bone marrow cells decreased significantly after ASCT: 20 % of patients acquired MRD-negative status, 10 % had a decrease in the number of abnormal PCs by one fold. Analysis of probability of immunochemical relapse showed that the worst prognosis was in patients with MRD-positive status before and after ASCT. During the MRD monitoring within 3-18 months, MRD-relapses were detected with the subsequent development of immunochemical relapse. The detection MRD in the dynamics is more informative than the study at only one step of therapy. It may help to select more adequate treatment for patient with multiple myeloma in each specific case.

**Keywords:** multiple myeloma, minimal residual disease, flow cytometry

## Введение

Множественная миелома (ММ) — опухолевое заболевание кроветворной ткани, характеризующееся клональной пролиферацией аномальных плазматических клеток (ПК) в костном мозге (КМ) и/или экстрамедуллярных очагах и секрецией моноклонального парапротеина. ММ составляет приблизительно 1 % среди всех злокачественных и 13 % среди гемопоэтических опухолей. В 2011 г. Международная рабочая группа по множественной миеломе сформулировала критерии для оценки ответа на терапию на основании количества ПК в пунктате КМ, наличия моноклональных иммуноглобулинов в сыворотке периферической крови и моче, соотношения свободных легких цепей (СЛЦ), характеристики остаточных очагов, определяемых с помощью компьютерной томографии (КТ) [1–3].

В процессе лечения ММ оптимальным является достижение полной ремиссии (ПР): количество ПК в КМ менее 5 %, отсутствие моноклональных парапротеинов в сыворотке периферической крови и моче, нормализация соотношения СЛЦ, отсутствие экстрамедуллярных очагов, установленное методом КТ [3]. В связи с внедрением в протоколы терапии новых эффективных лекарственных препаратов, таких как бортезомиб, талидомид, леналидомид, а также с проведением высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) увеличилась частота достижения ПР. Несмотря на это, количество рецидивов при ММ остается высоким, что связано с сохранением небольшого количества остаточных опухолевых клеток, не выявляемых рутинным морфологическим методом. Это состояние называется минимальной остаточной болезнью (МОБ).

Диагностика МОБ осуществляется высокотехнологичными методами, такими как многоцветная (не менее чем 6-цветная) проточная цитофлуориметрия (МПЦ), аллель-специфичная ПЦР и секвенирование, с чувствительностью исследования до  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ . В 2011 г. Международной рабочей группой по миеломе введено понятие иммунофенотипической ремиссии, которая устанавливается в период ПР и определяется как отсутствие аномальных ПК среди 1 млн и более проанализированных клеток КМ методом МПЦ. Основой выявления МОБ с помощью метода МПЦ является определение аномального иммунофенотипа миеломных ПК. Аномальный иммунофенотип — это сочетание экспрессии определенных маркеров дифференцировки (CD — clusters of differentiation), не характерное для нормальных ПК, но определяемое на миеломных ПК [4–7]. В 2016 г. Международной рабочей группой по множественной миеломе обращено внимание на необходимость сочетания поиска опухолевых клеток в КМ или крови с применением высокочувствительных методов (МПЦ или секвенирование нового поколения — СНП) и остаточных

очагов поражения с помощью визуализирующих методов: позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и ПЭТ/КТ. Введены следующие понятия:

1) устойчивый МОБ-негативный статус (отсутствие МОБ, подтвержденное методами МПЦ и / или) СНП и визуализирующими методами в течение как минимум 1 года);

2) МОБ-негативность, определяемая методами МПЦ и СНП с чувствительностью  $10^{-5}$  или выше;

3) МОБ-негативность, определенная методами МПЦ и / или СНП, и исчезновение очагов поражения, подтвержденное методами ПЭТ-КТ [8].

Важным этапом консолидации ремиссии является ВДХТ с последующей аутоТГСК, приводящая к повышению общей и безрецидивной выживаемости у больных с ММ.

**Цель** нашего исследования — определение МОБ методом МПЦ у пациентов с ММ до и после аутоТГСК, а также определение частоты достижения МОБ-негативного статуса у пациентов в период ПР после аутоТГСК на +100-й день и анализ частоты встречаемости аномальной экспрессии ряда антигенов на миеломных ПК.

## Материалы и методы

**Пациенты.** В исследование, проведенное на базе ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, были включены 40 пациентов с подтвержденной ММ, которые получали терапию бортезомиб-содержащими курсами. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток крови проводилась циклофосфаном в дозе 4 г/м<sup>2</sup> с последующим введением гранулоцитарного колониестимулирующего ростового фактора в дозе 5 мг/кг/сут. Режим кондиционирования (ВДХТ) перед аутоТГСК включал мелфалан (200 мг/м<sup>2</sup>). У всех пациентов (18 мужчин и 22 женщины в возрасте от 35 до 66 лет с медианой возраста 55 лет) была достигнута ПР на +100-й день после аутоТГСК: отсутствие секреции моноклонального парапротеина в моче и сыворотке, нормализованное соотношение СЛЦ, отсутствие внекостномозговых компонентов и менее 5 % ПК в КМ. У каждого пациента исследовали МОБ методом МПЦ в пунктате КМ, проводили иммунохимическое исследование мочи и сыворотки периферической крови до аутоТГСК, через 100 дней после аутоТГСК, а также через каждые последующие 3 мес.

**Иммунохимическое исследование.** Включало электрофоретическое исследование белков с иммунофиксацией и количественное определение СЛЦ методом Freelite. Иммунохимическим рецидивом считали любое количество вновь определяемого моноклонального парапротеина в сыворотке или моче.

**Проточная цитофлуориметрия.** К пунктату КМ объемом 0,5 мл добавляли 4,5 мл разведенного 1:10 раствора, лизирующего эритроциты, PharmLyse (BD Biosciences, США) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки осаждали цент-

рифугированием при 400g в течение 3 мин 30 с, затем отмывали в растворе CellWash (BD Biosciences, США). Для окрашивания моноклональными антителами в пробирки отбирали не менее ( $3 \times 10^6$ ) клеток. Использовали следующие моноклональные антитела (меченные флуорохромными красителями, все – производства BD Biosciences) к антигенам: CD38 FITC (клон HIT2), CD138 PE (клон Mi15), CD19 PerCP-Cy5.5 (клон J21C1), CD45 APC-Cy7 (клон 2D1), CD56 PE-Cy7 (клон NCAM16.2), CD27 APC (клон L128), CD28 APC (клон CD28.2). Инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, от несвязавшихся антител отмывали раствором CellWash. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США).

**Цитометрический анализ.** Для достижения максимальной чувствительности (0,001 %) осуществляли сбор ( $2 \times 10^6$ ) событий. Цитометрический анализ включал 2 этапа: 1) идентификацию всей популяции ПК в образце по экспрессии на поверхности клеток CD38, CD138, CD45 и параметрам прямого и бокового светорассеяния; 2) дифференциацию миеломных ПК от нормальных. Миеломными считали ПК, на которых обнаруживали не менее 2 признаков аномальной экспрессии антигенов: отсутствие CD19 или CD45, сниженную экспрессию CD38, наличие CD56 или CD28, отсутствие или сниженную экспрессию CD27 [7].

Анализ, в котором не удавалось найти популяцию аномальных ПК из 20 и более клеток и при отсутствии признаков значительного разведения КМ периферической кровью, считали отрицательным. Положительным анализ признавали в случае, когда обнаруживалась популяция аномальных ПК из 20 и более событий. В этом случае подсчитывалась доля (%) аномальных ПК от всех клеток КМ, выделенных по показателям прямого и бокового светорассеяния, а не от всех CD45-положительных событий (лейкоцитов). Данный способ был выбран в связи с наличием в КМ CD45-негативных ядросодержащих клеток – эритрокариоцитов, учет которых необходим для адекватной количественной оценки МОБ.

**Статистический анализ.** Проводился с помощью программного дополнения XLSTAT для Microsoft Excel. Для проверки достоверности различий между выборками парных измерений применяли критерий Вилкоксона. Построение кривых выживаемости осуществляли методом Каплана–Майера.

### Результаты

За основу была взята тактика 6-цветного проточно-цитометрического анализа [7], примеры которого приведены на рис. 1. Не всегда анализ был простым, так как имеются особенности экспрессии определенных антигенов (CD19, CD56, CD27, CD45, CD38 и CD28) на поверхности нормальных и миеломных ПК. Популяция нормальных ПК гетерогенна и среди

этих клеток могут встречаться субпопуляции с отсутствием CD19, наличием CD56 или CD28, что затрудняет дифференцировку нормальных и миеломных ПК. В таких случаях использовались дополнительные маркеры CD45, CD38 и CD27.

Проведен анализ частоты встречаемости аномально экспрессирующихся антигенов: aberrантное отсутствие CD19 было отмечено в 100 % случаев, CD45 не присутствовал на миеломных ПК в 86 %, CD56 экспрессировался в 66 % случаев, сниженная экспрессия CD38 отмечена в 65 % случаев. Аномальная экспрессия CD28 обнаруживалась в 45 % случаев, а аномальное отсутствие или сниженная экспрессия CD27 – в 73 % случаев (рис. 2).

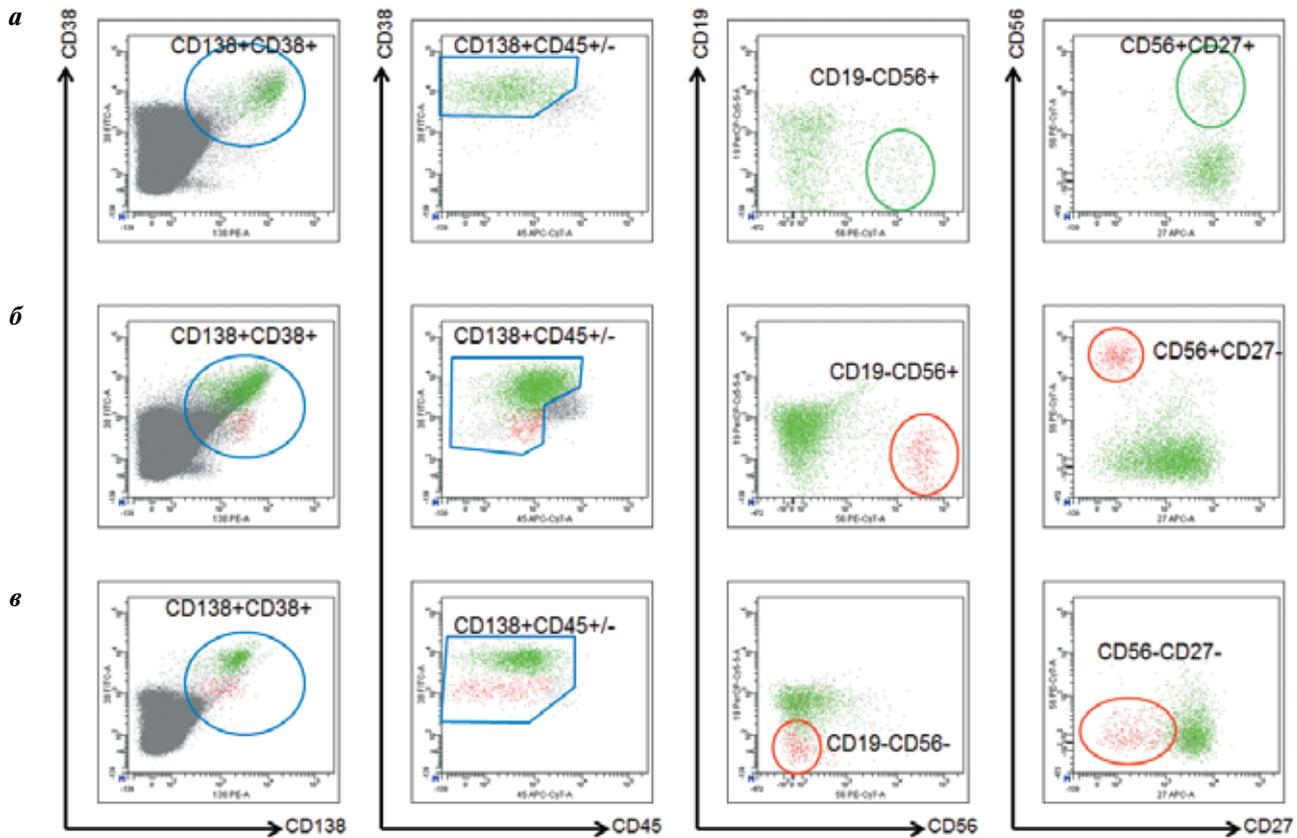
До проведения ВДХТ у 18 (45 %) из 40 пациентов, у которых была подтверждена ПР на +100-й день после аутоТГСК, МОБ не выявлялась, у 22 (55 %) определялись аномальные ПК в количестве 0,003–2,3 % (медиана – 0,016 %) от всех ядросодержащих клеток. После аутоТГСК на +100-й день МОБ-негативный статус зафиксирован у 25 (62,5 %) из 40 пациентов, аномальные ПК определялись у 15 (37,5 %) пациентов в количестве 0,001–0,192 % (медиана – 0,008 %).

У 17 из 18 пациентов после проведения аутоТГСК сохранился МОБ-негативный статус, и только у 1 пациента были обнаружены миеломные клетки в количестве 0,001 % от ядросодержащих клеток. Еще 8 пациентов приобрели МОБ-негативный статус на +100-й день после аутоТГСК. У 10 пациентов доля миеломных клеток уменьшилась после аутоТГСК в 2–64 раза (в среднем в 13 раз). У 4 пациентов количество аномальных ПК не изменилось после аутоТГСК и составило от 0,004 % до 0,1 % (табл. 1). С использованием критерия Вилкоксона была подтверждена гипотеза об уменьшении количества аномальных ПК после проведения ВДХТ с аутоТГСК ( $p = 0,002$ ).

Динамический мониторинг МОБ с частотой в 3 мес проведен у 36 из 40 пациентов. У 4 пациентов была исследована МОБ методом МПЦ только через 100 дней после проведения аутоТГСК. У 5 пациентов наблюдение длилось 3 мес, у 11 – 6 мес, у 8 – 9 мес, у 4 – 12 мес, у 3 – 15 мес и у 5 – 18 мес (табл. 2).

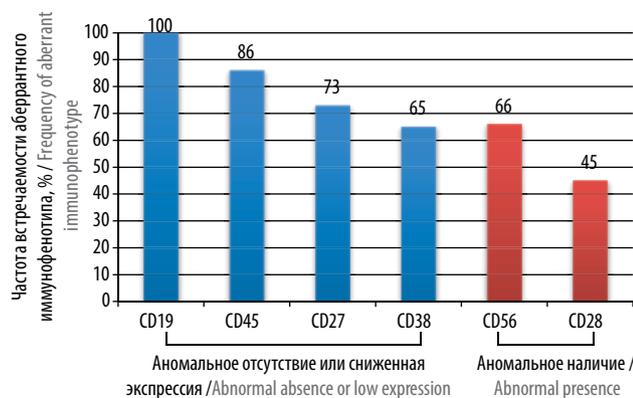
В период мониторинга МОБ был обнаружен иммунофенотипический рецидив у 7 (35,3 %) из 17 пациентов с МОБ-негативным статусом до и после аутоТГСК на +100-й день. Также иммунофенотипический рецидив обнаружился у 2 (25 %) из 8 пациентов, достигших МОБ-негативного статуса после проведения аутоТГСК на +100-й день (до аутоТГСК у данной группы пациентов выявлялись аномальные ПК). У 3 из этих 9 пациентов с иммунофенотипическим рецидивом подтвердили иммунохимический рецидив.

У 2 пациентов не было выявлено аномальных ПК ни на одном из этапов мониторинга МОБ после аутоТГСК, но был зафиксирован иммунохимический рецидив через 3 и 12 мес после проведения аутоТГСК.



**Рис. 1.** Примеры точечных диаграмм цитометрического анализа плазматических клеток (ПК): а – ПК здорового донора. Диаграммы CD38 vs CD138 и CD38 vs CD45 используются для четкого отделения ПК от других клеток. На диаграммах CD19 vs CD56 и CD56 vs CD27 большинство нормальных ПК имеют иммунофенотип CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> и небольшие субпопуляции CD19<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup> и CD27<sup>-</sup>; б – пример выявления у пациента с множественной миеломой аномальных ПК (выделены красным цветом) с иммунофенотипом CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> со сниженной экспрессией CD38 и положительной экспрессией CD45; в – пример выявления миеломных ПК (выделены красным цветом) с иммунофенотипом CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> со сниженной экспрессией CD38 и гетерогенной экспрессией CD45

**Fig. 1.** Examples of cytometric point diagrams of plasma cells (PC): a – PCs of a healthy donor. Diagrams CD38 vs CD138 and CD38 vs CD45 are used to clearly separate the PC from other cells. The CD19 vs CD56 and CD56 vs CD27 diagrams show that most normal PCs have CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> immunophenotype, but there are small subpopulations of CD19<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup> and CD27<sup>-</sup>; б – an example of anomalous PC in MM patient (red) with CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> immunophenotype with reduced CD38 expression and positive CD45 expression; в – an example of myeloma PCs (red) with CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> immunophenotype with reduced CD38 expression and heterogeneous CD45 expression



**Рис. 2.** Частота встречаемости аномально-экспрессирующихся антигенов на миеломных плазматических клетках

**Fig. 2.** Frequency of anomalous-expressed antigens on myeloma plasma cells

На этих же этапах диагностики у данных пациентов методом КТ был определен новый очаг специфического поражения.

В группе пациентов ( $n = 15$ ), у которых МОБ определялась на +100-й день после аутоТГСК, в период динамического исследования МОБ отмечалось постепенное нарастание доли аномальных ПК. Впоследствии иммунохимический рецидив обнаружили в течение 3–12 мес у 5 пациентов.

Выполнены исследования МОБ у 31 больного на следующих этапах мониторинга: до аутоТГСК, на +100-й день, через 3 и 6 мес после аутоТГСК (рис. 3). Среди них были: 15 пациентов с МОБ-негативным статусом до и после аутоТГСК, 5 пациентов, достигших МОБ-негативного статуса после аутоТГСК, и 10 пациентов, у которых аномальные ПК выявлялись до и после аутоТГСК. После проведения аутоТГСК доля аномальных ПК на +100-й день статистически значимо снижалась ( $p = 0,0021$ ), но в период дальнейшего наблюдения отмечалось постепенное нарастание доли аномальных ПК ( $p = 0,0134$ ).

Динамика изменения доли аномальных ПК не у всех 40 пациентов оказалась однонаправленной

**Таблица 1.** Распределение пациентов в зависимости от изменения количества аномальных плазматических клеток (ПК) на +100-й день после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) по сравнению с исследованием до аутоТГСК

**Table 1.** The distribution of patients, depending on the number of abnormal plasma cells (PCs) at day +100 after autologous hematopoietic stem cells transplantation (ASCT), compared with the number before ASCT

МОБ на +100-й день после аутоТГСК MRD on day +100 after ASCT	МОБ до аутоТГСК MRD before ASCT	
	МОБ <sup>+</sup> , n = 22 MRD <sup>+</sup> , n = 22	МОБ <sup>-</sup> , n = 18 MRD <sup>-</sup> , n = 18
МОБ <sup>+</sup> , n = 15 MRD <sup>+</sup> , n = 15	14 В том числе: МОБ↓ – 10 МОБconst – 4 14 Of them: MRD↓ – 10 MRDconst – 4	1
МОБ <sup>-</sup> , n = 25 MRD <sup>-</sup> , n = 25	8	17

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: МОБ – минимальная остаточная болезнь, МОБ<sup>+</sup> и МОБ<sup>-</sup> – минимальная остаточная болезнь с позитивным и негативным статусом соответственно; МОБ↓ – количество аномальных ПК снизилось после аутоТГСК; МОБconst – количество аномальных ПК не изменилось после аутоТГСК.

*Note.* MRD – minimal residual disease, MRD<sup>+</sup> and MRD<sup>-</sup> – minimal residual disease with positive and negative status, respectively; MRD↓ – the number of abnormal PCs decreased after ASCT; MRDconst – the number of anomalous PCs did not change after ASCT

**Таблица 2.** Распределение пациентов по минимальной остаточной болезни (МОБ) при динамическом мониторинге на разных сроках наблюдения

**Table 2.** The distribution of patients according to minimal residual disease in dynamic monitoring during different periods of observation

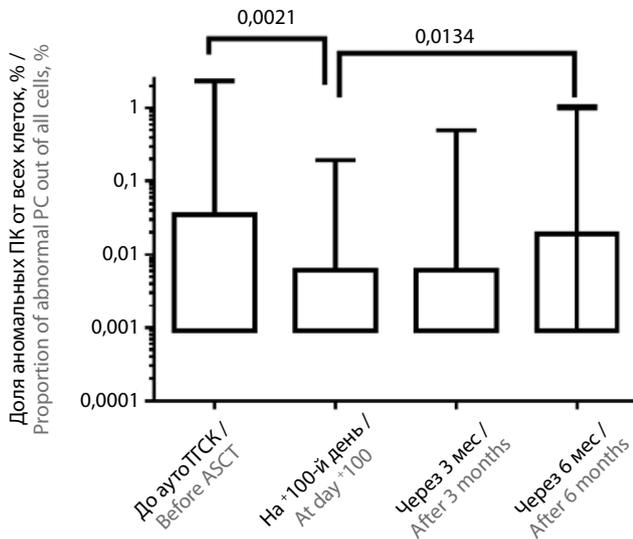
Время проведения исследования Time of MRD detection	Число пациентов, n Number of patients, n	Число пациентов с МОБ, n (%) The number of patients with MRD, n (%)	
		МОБ <sup>+</sup> MRD <sup>+</sup>	МОБ <sup>-</sup> MRD <sup>-</sup>
До аутоТГСК Before ASCT	40	22 (55,0)	18 (45,0)
На +100-й день On day +100	40	15 (37,5)	25 (62,5)
Через 3 мес After 3 month	36	14 (38,9)	22 (61,1)
Через 6 мес After 6 month	31	11 (35,5)	20 (64,5)
Через 9 мес after 9 month	20	9 (45,0)	11 (55,0)
Через 12 мес After 12 month	12	6 (50,0)	6 (50,0)
Через 15 мес After 15 month	8	3 (37,5)	5 (62,5)
Через 18 мес After 18 month	5	3 (60,0)	2 (40,0)

**Примечание.** АутоТГСК – трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток.

*Note.* ASCT – autologous hematopoietic stem cells transplantation.

и равномерной. У 6 из них положительный МОБ-статус в следующей точке исследования сменился на негативный (у одного – на +3 мес, у четырех – на +6 мес и у одного – на +15 мес). У 3 из них в дальнейшем вновь была выявлена МОБ.

Также нами проведен анализ вероятности развития иммунохимического рецидива в зависимости от МОБ-статуса. Вероятность его развития была ниже в группе пациентов, у которых МОБ не выявлялась перед аутоТГСК (медиана не достигнута vs 476 дней в группе



**Рис. 3.** Доля аномальных плазматических клеток (ПК) у 31 пациента до трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) и после нее на +100-й день и через 3 и 6 мес  
**Fig. 3.** Proportion of abnormal plasma cells (PC) in 31 patients before autologous hematopoietic stem cells transplantation (ASCT), at day +100, 3 and 6 months after ASCT

МОБ<sup>+</sup> перед аутоТГСК,  $p = 0,0155$ ) (рис. 4а) или был МОБ-негативный статус на +100-й день после аутоТГСК (медиана не достигнута vs 517 дней в группе МОБ<sup>+</sup> на +100-й день,  $p = 0,0241$ ) (см. рис. 2б). Анализируя данные, мы выделили 3 группы пациентов: в I группе аномальных ПК не было ни до, ни после аутоТГСК; во II группе аномальные ПК выявлялись только до или только после аутоТГСК; в III группе имелся МОБ-позитивный статус до и после аутоТГСК. Представленные кривые свидетельствуют о том, что наибольшая вероятность развития иммунохимического рецидива была у пациентов с выявляемыми ПК до и после аутоТГСК (медианы в группах I и II не достигнуты vs 517 дней в группе III,  $p = 0,0171$ ) (рис. 4в).

### Обсуждение результатов

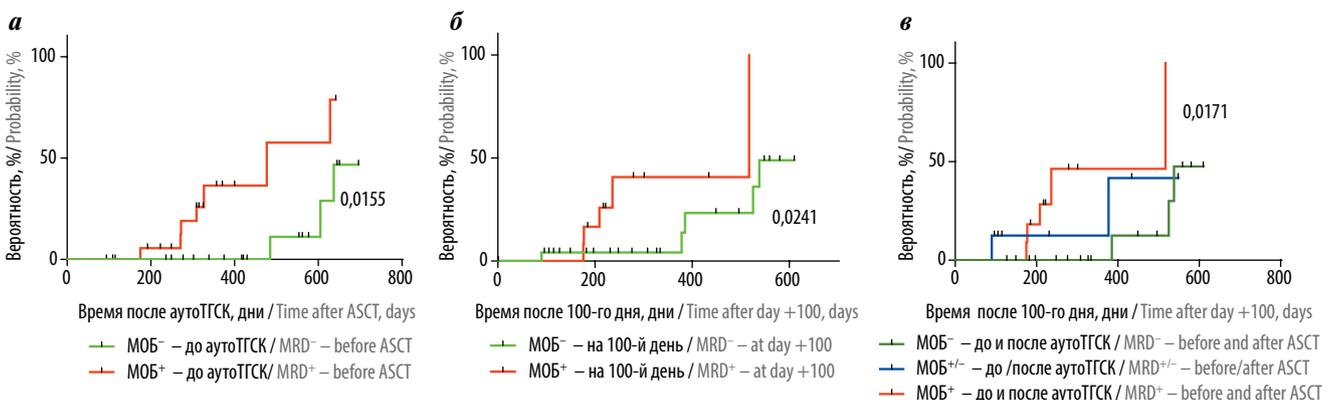
В процессе накопления опыта по оценке МОБ с помощью МПЦ были выбраны обязательные анти-

гены (CD38, CD138, CD45, CD19, CD56), включение которых в исследование является необходимым. С помощью данного набора маркеров можно обнаружить МОБ в 80 % случаев с чувствительностью до 0,01 % [7]. Однако нами было показано, что при исследовании КМ у пациентов с ПР доля выявляемых аномальных ПК часто ниже 0,01 %. У 8 из 15 пациентов с детектируемой МОБ на +100-й день после аутоТГСК доля аномальных ПК варьировала от 0,001 до 0,008 %, и только у 7 она составляла 0,01 % и выше. Очевидно, что детекция МОБ оптимальна при увеличении чувствительности хотя бы до 0,001 %, однако это ведет к тому, что начинают определяться нормальные ПК с иммунофенотипом, «имитирующим» миеломные ПК: CD45<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup> и/или CD56<sup>+</sup> (см. рис. 1а). Поэтому для сохранения специфичности и повышения достоверности результатов требуется исследование дополнительных маркеров на поверхности ПК, таких как CD27, CD28, CD117, CD20, CD81, CD200 и др.

Полученные нами данные о частоте встречаемости различных аберраций экспрессии антигенов на остаточных аномальных ПК согласуются с данными зарубежных публикаций, в которых встречаются:

- сниженная экспрессия CD38 – в 80 % случаев (согласно нашим результатам, в 65 %),
- отсутствие CD19 и CD45 – соответственно в 96 и 80 % случаев (по нашим данным, в 100 и 86 %),
- экспрессия CD56 и CD28 – соответственно в 60–75 и 15–45 % случаев (по нашим данным, в 66 и 45 %),
- отсутствие CD27 – в 40–68 % случаев (по нашим данным, в 73 %) [9].

В 2014–2015 гг. в качестве дополнительного маркера для отличия нормальных ПК от миеломных нами был выбран маркер CD28. Однако в международных рекомендациях по диагностике МОБ при ММ, опубликованных в 2015 г. [7], маркер CD28 не применялся, но при этом обязательным для исследования был антиген CD27, поэтому в 2016 г. мы изменили панель моноклональных антител и заменили анти-CD28 на анти-CD27.



**Рис. 4.** Вероятность развития иммунохимического рецидива в зависимости от наличия минимальной остаточной болезни: а – до трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК), б – на +100-й день после аутоТГСК; в – до и после аутоТГСК  
**Fig. 4.** Probability of immunochemical relapse development depending on the presence of MRD: а – before autologous hematopoietic stem cells transplantation (ASCT), б – on day+100 after ASCT, в – before and after ASCT

По нашим данным, аберрантная экспрессия CD27 встречалась чаще по сравнению с CD28 (73 % vs 45 % соответственно). Кроме того, CD28 встречается и на ПК здоровых доноров, что увеличивает риск получения ложноположительных результатов. В КМ здоровых доноров часто могут быть обнаружены ПК, соэкспрессирующие CD28 и CD56, но экспрессии CD56 на ПК с отсутствующей экспрессией CD27 в норме не встречается (см. рис. 1а). Использование в качестве дополнительного маркера CD27 является более предпочтительным, чем CD28, так как он позволяет достовернее установить опухолевую природу ПК, особенно для миеломных ПК с отсутствием CD19 и наличием экспрессии CD56 (см. рис. 1б). При отсутствии экспрессии CD56 на миеломных клетках детектировать МОБ становится труднее, в этом случае помогает не только CD27, но и сниженная экспрессия CD38 на миеломных ПК по сравнению с нормальными ПК (см. рис. 1в). Но при наличии положительной экспрессии CD27 и / или CD38 дифференцировать малое количество миеломных клеток практически невозможно, для этого требуется исследование дополнительных маркеров, таких как CD81 и CD117, а также применение не менее чем 8-цветного проточного цитофлуориметра.

Основная часть нашей работы была посвящена исследованию МОБ после аутоТГСК и дальнейшему мониторингу МОБ у пациентов с ММ каждые 3 мес. Данные исследований S.Y. Kristinsson и соавт. [10] и S.K. Kumar и соавт. [11] показали, что проведение ВДХТ увеличивает частоту достижения ПР, удлиняет время до прогрессирования заболевания и общую выживаемость [3, 11].

В нашем исследовании было показано, что 8 (36,4 %) из 22 пациентов, у которых выявлялись аномальные ПК до аутоТГСК, достигли МОБ-негативного статуса на +100-й день после аутоТГСК, а у 10 (45,4 %) отмечено снижение доли аномальных ПК на порядок. Среди 18 больных, у которых аномальные ПК не выявлялись методом МПЦ до ВДХТ, 17 (94,4 %) пациентов сохранили МОБ-негативный статус после аутоТГСК на +100-й день.

Таким образом, доказано, что проведение ВДХТ с последующей аутоТГСК приводит к достоверному снижению доли аномальных ПК ( $p = 0,002$ ), способствует достижению МОБ-негативного статуса или сохраняет его, если аномальные ПК не выявлялись до проведения ВДХТ.

В ходе динамического мониторинга МОБ установлено, что у пациентов с выявленной МОБ после аутоТГСК (на +100-й день) отмечалось постепенное увеличение доли аномальных ПК с течением времени, у 5 из них впоследствии развился иммунохимический рецидив. У 8 из 25 пациентов с МОБ-негативным статусом на +100-й день после аутоТГСК (независимо от наличия МОБ до ВДХТ) появились аномальные ПК, причем у 3 из этих 8 также подтвердился рецидив секреции патологического парапротеина. Мониторинг

МОБ помогает оценить динамику опухолевой популяции, что позволяет использовать данный подход как дополнительный фактор, влияющий на принятие решения о проведении поддерживающей терапии после аутоТГСК.

В период всего наблюдения МОБ не выявлялась у 2 пациентов, однако возник рецидив секреции моноклонального парапротеина. Вероятно, это было связано с тем, что у них развились новые специфические очаги поражения, подтвержденные данными КТ. Возникновение и сохранение внекостномозговых очагов поражения является ограничением применения метода МПЦ для оценки МОБ, так как материалом для исследования служит пунктат КМ. Поэтому целесообразно периодическое обследование пациентов визуализирующими методами, такими как КТ, ПЭТ или МРТ. При применении этих методов будет возможно проведение «нацеленной» пункции и аспирации материала из очага поражения для подтверждения опухолевой природы клеток.

Таким образом, несмотря на то что выполнение аутоТГСК приводит к снижению доли аномальных миеломных ПК, с течением времени у ряда пациентов количество миеломных ПК постепенно увеличивается и развивается сначала иммунофенотипический, а затем и иммунохимический рецидив.

Сохранение аномальных ПК на всех этапах терапии является неблагоприятным фактором. В исследовании В. Paiva и соавт. [4] 5-летняя выживаемость без прогрессии была значимо выше (62 % vs 30 %,  $p < 0,001$ ) в группе пациентов с МОБ-негативным статусом, достигнутым на +100-й день после аутоТГСК, по сравнению с теми пациентами, у которых МОБ выявлялась, при этом у всех пациентов была ПР. В этом же исследовании показана возможность применения МОБ-статуса до и после аутоТГСК в качестве фактора прогноза. Пациенты, у которых МОБ определялась и до, и после аутоТГСК, имели наихудший прогноз вследствие химиорезистентности (медиана выживаемости без прогрессии – 40 мес). МОБ-позитивные до аутоТГСК пациенты в случае приобретения МОБ-негативного статуса после аутоТГСК были отнесены к группе промежуточного риска (медиана выживаемости без прогрессии – 71 мес). Пациенты, которые достигли раннего ответа до аутоТГСК, у которых МОБ не выявлялись ни до аутоТГСК, ни после, имели благоприятный прогноз (медиана выживаемости без прогрессии не достигнута) [4]. Эти данные соотносятся с результатами, полученными в нашей работе. При анализе вероятности развития иммунохимического рецидива наихудший прогноз был в группе пациентов с МОБ-позитивным статусом до и после аутоТГСК.

У ряда (15 %) пациентов была обнаружена неравномерная динамика в изменении доли аномальных ПК: положительный МОБ-статус сменялся негативным и наоборот. Возможно, это было связано с тем,

что поражение КМ у данных пациентов было очаговым и результат исследования зависел от места, где была проведена пункция КМ. Известно также, что 2 из этих пациентов была проведена поддерживающая терапия (леналидомид или бортезомиб). Не исключено, что поддерживающая терапия также могла способствовать элиминации ранее обнаруживаемых миеломных ПК. Данные клинических исследований Medical Research Council Myeloma IX trial подтвердили, что поддерживающая терапия талидомидом помогла 28 % пациентов приобрести МОБ-негативный статус [12].

### Заключение

Можно сказать, что высокочувствительный метод МПЦ позволяет детектировать миеломные клетки в КМ у пациентов, достигших ПР. Проведение ВДХТ

с последующей аутоТГСК способствует клиренсу опухолевой массы и сохранению МОБ-негативного статуса, который был достигнут у пациентов до аутоТГСК. По данным анализа вероятности развития иммунохимического рецидива, самый плохой прогноз был в группе пациентов с МОБ-позитивным статусом до и после аутоТГСК. Более полную информацию предоставляет динамическое исследование количества аномальных ПК на протяжении лечения. Введение визуализирующих методов исследования в стандартное обследование пациентов позволяет выявлять экстрамедуллярные поражения. Сочетание МПЦ и КТ или ПЭТ, или МРТ позволяет наиболее полно оценить глубину ответа на терапию. Результаты этих исследований могут способствовать выбору более адекватной тактики лечения ММ в каждом конкретном случае.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Покровская О.С. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы. Гематология и трансфузиология 2016;61(2):1–24. [Mendeleeva L.P., Votyakova O.M., Pokrovskaya O.S. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and transfusiology, 2016;61(2):1–24 (In Russ.)]. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1.
2. Rajkumar S., Dimopoulos M., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 2014;15(12):538–48. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70442-5. PMID: 25439696.
3. Покровская О.С., Менделеева Л.П., Урнова Е.С. и др. Мобилизация аутологичных гемопоэтических клеток с использованием высоких доз циклофосфана и Г-КСФ у больных множественной миеломой. Вестник гематологии 2009;5(2):33–4. [Pokrovskaya O.S., Mendeleeva L.P., Urnova E.A. et al. Autologous hematopoietic cells mobilization using high doses of cyclophosphamide and G-CSF in patients with multiple myeloma. Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology, 2009;5(2):33–4 (In Russ.)].
4. Paiva B., Vidriales M., Cervero J. et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. Blood 2008;112(10):4017–23. DOI: 10.1182/blood-2008-05-159624. PMID: 18669875.
5. Paiva B., Almeida J., Pérez-Andrés M. et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. Cytometry B Clin Cytom 2010;78(4):239–52. DOI:10.1002/cyto.b.20512. PMID: 20155853.
6. Rawstron A., Orfao A., Beksac M. et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Haematologica 2008;93(3):431–8. DOI:10.3324/haematol.11080. PMID: 18268286
7. Stetler-Stevenson M., Paiva B., Stoolman L. et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. Cytometry B Clin Cytom. 2015;90(1):26–30. DOI:10.1002/cyto.b.21249. PMID: 25907102
8. Rajkumar S.V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2016;91(7):719–34. DOI: 10.1002/ajh.24402. PMID: 27291302
9. Flores-Montero J., de Tute R., Paiva B. et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. Cytometry B Clin Cytom 2015;90(1):61–72. DOI:10.1002/cyto.b.21265. PMID: 26100534
10. Kristinsson S.Y., Landgren O., Dickman P.W. et al. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. J Clin Oncol 2007;25(15):1993–9. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.0100. PMID: 17420512.
11. Kumar S. K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. Blood 2008;111(5):2516–20. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129. PMID: 17975015.
12. Rawstron A., Child J., de Tute R. et al. Minimal Residual Disease Assessed by Multiparameter Flow Cytometry in Multiple Myeloma: Impact on Outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. J Clin Oncol 2013;31(20):2540–7. DOI:10.1200/jco.2012.46.2119. PMID: 23733781.

## Генотипирование групп крови систем АВО и резус у пациентов после множественных гемотрансфузий

Р.С. Каландаров, Л.Л. Головкина, М.Н. Васильева, А.Г. Стремоухова,  
Т.Д. Пушкина, Г.В. Агрощенко, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Рахман Самиевич Каландаров rkalandari@yandex.ru

**Введение.** У пациентов, перенесших множественные гемотрансфузии, серологическое определение групп крови систем АВО и резус становится невозможным вследствие посттрансфузионного химеризма, т. е. циркуляции в крови 2 популяций эритроцитов — собственных и донорских. Решить эту проблему помогает генотипирование групп крови.

**Обзор литературы** включает 42 источника литературы, в том числе 9 отечественных и 33 зарубежных.

**Материалы и методы.** Образцы крови 24 гематологических больных, перенесших многочисленные трансфузии эритроцитосодержащих сред. Антигены А и В, Rh D, Rh C/c, Rh E/e определяли серологическим методом с применением моноклональных антител анти-А, анти-В, анти-Д, анти-С, анти-С<sup>w</sup>, анти-с, анти-Е и анти-е (Моabs) («Гематолог», Россия). Наличие химеризма устанавливали методом гемагглютинационного типирования в гелевых колонках ID-Cards «DiaClon ABO/D+Reverse Grouping» и «DiaClon Rh-subgroups+K». Экстракт дезоксирибонуклеиновой кислоты исследовали методом PCR-SSP с помощью коммерческих наборов с праймерами ABO-TYPE и RH-TYPE (BAG, Germany).

**Результаты.** У 2 пациентов с 50 % химеризмом, выявленным моноклональными антителами анти-А и анти-В, генотипически определена группа крови системы АВО. Молекулярный метод позволил идентифицировать генотип системы резус 24 больным, у которых серологическим методом выявлен процент смешанной популяции эритроцитов 20–95 по 1–5 антигенам. Определение групп крови серологическими методами через 4 мес после прекращения гемотрансфузий подтвердило все результаты генотипирования.

**Заключение.** Генотипирование целесообразно применять для определения групп крови пациентов, перенесших многочисленные трансфузии эритроцитосодержащих сред, что позволяет повысить иммунологическую безопасность и предотвратить аллоиммунизацию к клинически значимым групповым антигенам эритроцитов.

**Ключевые слова:** гемотрансфузия, посттрансфузионный химеризм, генотипирование групп крови

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-70-79

### Genotyping of ABO and Rh systems blood groups in patients after multiple hemotransfusions

R.S. Kalandarov, L.L. Golovkina, M.N. Vasilieva, A.G. Stremouchova, T.D. Pushkina, G.V. Atroshchenko, E.N. Parovichnikova  
Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Noviy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

**Introduction.** In patients after multiple blood transfusions, the serological determination of ABO and Rhesus blood groups becomes unreliable due to posttransfusion chimerism, i.e., circulation in the blood of two erythrocytes populations — own and donors. To solve this problem helps the genotyping of blood groups.

**The literature review** includes 42 literature sources, including 9 Russian and 33 foreign articles.

**Materials and methods.** The authors typed blood samples of 24 patients with hematological disorders after numerous erythrocyte-containing transfusions. Antigens A and B, Rh D, Rh C/c, Rh E/e were determined by the serological method using monoclonal antibodies anti-A, anti-B, anti-D, anti-C, anti-C<sup>w</sup>, anti-c, E and anti-e (Moabs) (Hematologist, Russia). The presence of chimerism was established by hemagglutination typing in gel columns ID-Cards «DiaClon ABO / D + Reverse Grouping» and «DiaClon Rh-subgroups + K». The DNA extract was examined by PCR-SSP using commercial primers ABO-TYPE and RH-TYPE (BAG, Germany).

**Results.** In two patients with 50% chimerism with anti-A and anti-B monoclonal antibodies, the ABO blood group was genotypically identified. Using molecular method presence of Rhesus system antigens was established in 24 patients with 20-95% chimerism for 1-5 antigens. Serological determination of blood groups at 4 months after the cessation of blood transfusions has confirmed all genotyping results.

**Conclusion.** Genotyping is advisable to use to determine the blood groups in patients after numerous erythrocyte-containing transfusions, which allows increasing immunological safety and preventing alloimmunization to clinically significant erythrocytes antigens.

**Key words:** blood transfusion, posttransfusion chimerism, blood group genotyping

#### Введение

Пациенты с неэффективным гемопоэзом и анемией нуждаются в частых трансфузиях эритроцитов.

В крови пациентов, перенесших трансфузии в течение 4 предшествующих месяцев, циркулируют как минимум 2 популяции эритроцитов — собственные

и донорские. Это явление называется посттрансфузионным химеризмом. При химеризме серологическое определение групп крови становится ненадежным. Известно об иммуногенетическом типировании таких антигенов, как А, В, D, С, с, Е, е. Анализ дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) пригоден для клинического применения в различных ситуациях, особенно для идентификации групповых антигенов крови у гематологических больных, перенесших множественные гемотрансфузии.

### Обзор литературы

Системы АВ0 и резус – важнейшие антигенные системы эритроцитов для практической трансфузиологии. Учет совместимости доноров и реципиентов по группе крови системы АВ0 и резус-фенотипу при гемотрансфузиях является обязательным условием предупреждения гемолитических посттрансфузионных реакций и осложнений. Современная литература, посвященная данным антигенным системам, охватывает различные аспекты, связанные с иммуногематологическим обеспечением безопасности трансфузий эритроцисодержащих компонентов крови.

Современная общая концепция иммунологической безопасности переливания эритроцитов была предложена ФГБУ «Гематологический научный центр» (ГНЦ) Минздрава России. В ней предусматривается учет совместимости донора и реципиента по 10 трансфузионно опасным антигенам эритроцитов, принадлежащим к системам АВ0, резус и Келл: А, В, D, С, с, С<sup>w</sup>, Е, е, К, k [1]. При этом совместимость по системе АВ0 определяется, как и прежде, в соответствии с общеизвестным правилом Оттенберга. Переливать реципиентам донорские эритроциты крови следует с учетом наличия/отсутствия в них антигенов А/В, т.е. можно переливать эритроциты:

- группы крови 0(I) без антигенов А и В – пациентам с любой группой крови;
- группы А(II) с антигеном А – пациентам с группами крови А(II) и АВ(IV), т.е. реципиентам, в плазме крови которых нет естественных антител анти-А (агглютинины α по старой номенклатуре);
- группы В(III) с антигеном В – реципиентам с группами В(III) и АВ(IV), т.е. больным, в плазме крови которых нет естественных антител анти-В (агглютинины β);
- группы АВ(IV) с антигенами А и В – только пациентам с группой АВ(IV), так как у этих реципиентов в плазме нет естественных антител системы АВ0.

Таким образом, доноры с группой крови 0(I) считаются «универсальными донорами» (их эритроциты можно переливать пациентам с любой группой крови), а реципиенты с группой АВ(IV) – «универсальными реципиентами» (им можно переливать эритроциты любой группы).

В то же время при переливании плазмы крови действует противоположное правило. Переливать можно плазму крови:

- группы 0(I) с естественными антителами А и В – только больным с группой 0(I), так как только у них на эритроцитах нет антигенов системы АВ0;
- группы А(II) с антителом В – пациентам с группами крови 0(I) и А(II);
- группы В(III) с антителом А – пациентам с группами крови 0(I) и В(III);
- группы АВ(IV) без агглютининов – реципиентам любой группы.

Как отмечается в литературе, несмотря на относительную несложность процедуры определения группы крови и наличие сейчас эффективных реактивов (в том числе моноклональных реагентов, позволяющих выявлять слабые варианты антигена А), в настоящее время в клинической практике все-таки совершаются ошибки [2, 3]. Чаще всего эти они связаны с человеческим фактором при массовых исследованиях «на потоке», работе в ночное время, экстренных ситуациях в хирургии и реанимации и др. Такие условия способствуют возникновению как технических ошибок (порядок расположения реагентов, нарушение соотношения реагентов, несоблюдение необходимой продолжительности наблюдения, неправильная запись и др.), так и ошибок, связанных с возможным наличием трудноопределимых групп крови (подгруппы крови, кровяные химеры и др.). Поэтому определять группу крови должен специально подготовленный и специалист-иммуногематолог с опытом работы.

Для обеспечения совместимости донора и реципиента по резус-фенотипу в соответствии с приложением к приказу по ГНЦ № 39 от 08.05.2007 г. «О совершенствовании гемотрансфузионного обеспечения клиник института» доноров делят на 3 группы [1]:

1. Идентичные доноры и совместимые доноры – лица, не имеющие антигенов, отсутствующих у реципиента (например, для реципиента с резус-фенотипом СсDee совместимыми являются доноры с резус-фенотипами СсDee, ССDee, Ссddee, ссddee). Кровь идентичного донора может быть перелита больному без риска аллоиммунизации.
2. Донор 2-й очереди – донор, имеющий 1 минорный антиген, которого нет у реципиента (например, донор СсDEe и реципиент СсDee).
3. Донор 3-й очереди – донор, имеющий 2 минорных антигена, которых нет у реципиента (например, донор ссDEe и реципиент ССDee).

Переливание крови доноров 2-й и 3-й очереди допускается только по жизненным показаниям при условии, что у реципиента нет антител против этих антигенов.

В настоящее время продолжается совершенствование концепции иммунологической безопасности гемотрансфузий. Так, в лаборатории клиники внесено предложение о стандартизации скрининга антиэри-

троцитарных антител, что позволит освободить врача-трансфузиолога от постановки сложных проб на совместимость. Кроме того, отмечена необходимость контроля качества (удаление лейкоцитов, отсутствие снижения гемоглобина) обедненной лейкоцитами эритроцитной взвеси [4].

Продолжается изучение вопроса об аллосенсибилизации, связанной с существованием различных вариантов антигена D, и в связи с этим о людях, которые как доноры считаются резус-положительными (их кровь нельзя переливать резус-отрицательным реципиентам), а как реципиенты – резус-отрицательными (им самим можно переливать только резус-отрицательную кровь). По современным представлениям, таких людей, кроме тех, кто не имеет антигена D, но имеет антиген C или E (например, Ccdee или ccdeE), можно разделить еще на 3 группы [5].

В первую группу включают людей, на эритроцитах которых присутствуют слабые по агглютинационной способности варианты антигена D, которые обозначаются как антиген D<sup>weak</sup> (или D<sup>u</sup>) [6]. Появление слабых вариантов антигена D связано с точечными мутациями гена *RHD*. Различия между D и D<sup>weak</sup> носят не качественный, а только количественный характер, т. е. на эритроцитах D<sup>weak</sup> содержится меньшее количество детерминант антигена D, в связи с чем такие эритроциты слабее реагируют на анти-D антитела (низкая авидность антигена). Авидность разных вариантов D<sup>weak</sup> неодинакова: наиболее сильные реагируют с моноклонами на плоскости, хотя и относительно слабо, другие проявляются в реакции солевой агглютинации, самые слабые выявляются только в непрямой пробе Кумбса. Вероятность выработки анти-D антител у реципиентов с D<sup>weak</sup> невелика, но она все-таки существует [7]. Поэтому для полного исключения такой возможности этим пациентам рекомендуется переливать резус-отрицательные эритроциты. Переливание эритроцитов с D<sup>weak</sup> резус-отрицательным больным противопоказано (вероятность такого переливания также незначительна, так как в подавляющем большинстве случаев на этих эритроцитах есть антиген C или E, т. е. такие доноры будут считаться положительными, даже если слабый D не будет выявлен). Таким образом, лиц с антигеном D<sup>weak</sup> следует считать резус-положительными как доноров и резус-отрицательными как реципиентов. Однако дискуссии об иммунологических свойствах слабых вариантов антигена D продолжаются [8].

Во вторую группу объединены лица, имеющие на эритроцитах не все эпитопы антигена D (D<sup>partial</sup>). При оценке иммуногенных свойств антигена D следует иметь в виду, что этот антиген имеет сложную структуру и состоит из разных частей – эпитопов (всего их 36), которые сами по себе могут быть самостоятельными иммуногенами. У некоторых людей антиген D может содержать не все эпитопы. Такие варианты антигена D называют парциальными D-антигенами

(D<sup>partial</sup>) [9] и их синтез также обусловлен точечными мутациями гена. При гемотрансфузии донорских эритроцитов с обычным антигеном D, содержащим все эпитопы, у реципиентов с парциальным антигеном D могут вырабатываться парциальные анти-D антитела, направленные против отсутствующего у них эпитопа. Образование парциальных анти-D антител возможно также при беременности [10]. Таким образом, вероятность выработки у D-положительных лиц анти-D антител не исключена. Повторное переливание этим пациентам резус-положительных эритроцитов, содержащих все эпитопы, может привести к тяжелым посттрансфузионным осложнениям. Соответственно с парциальным D доноры тоже являются резус-положительными, а реципиенты – резус-отрицательными. В клинической практике для профилактики подобных посттрансфузионных осложнений важное значение имеет применение тройной биопробы при гемотрансфузиях.

Третья группа – это лица с антигеном D<sub>el</sub>. В некоторых странах Азии (Китай, Япония) обнаружен своеобразный вариант антигена D – D<sub>el</sub>. Это крайне слабый антиген, который не выявляется ни одним серологическим методом, в том числе и в непрямой пробе Кумбса, и может быть определен только при генетическом исследовании [11]. Однако в настоящее время уже доказано, что этот антиген способен вызывать синтез антител анти-D у резус-отрицательных лиц [12]. В частности, доказан факт вторичной иммунизации антигеном D<sub>el</sub> резус-отрицательной пациентки, ранее уже сенсибилизированной резус-положительными эритроцитами [13]. Поэтому люди с таким антигеном также считаются резус-положительными как доноры и резус-отрицательными как реципиенты.

В клинической лабораторной диагностике факт наличия разнообразных вариантов антигена D доказывает все более возрастающую роль молекулярно-генетической диагностики, позволяющей максимально эффективно определять эти варианты [14].

Ввиду того, что при переливании эритроцитов от доноров, в крови которых присутствуют антиэритроцитарные антитела, способные вызвать гемолиз эритроцитов реципиента, несомненный интерес представляет вопрос о правилах скрининга аллоантител у доноров и о возможности привлечения к донорству сенсибилизированных лиц [15]. Отмечено, что в настоящее время в Российской Федерации исследование антиэритроцитарных антител у доноров проводится по тем же правилам, что и у реципиентов (скрининг с 3 образцами фенотипированных тест-эритроцитов в непрямом антиглобулиновом тесте), а применение компонентов крови от доноров с антителами запрещено. В то же время в других странах при исследовании крови доноров допускается использование менее чувствительных, чем при исследовании крови реципиентов, серологических методов, а также применение только 2 образцов тест-эритроцитов. Это

допустимо, поскольку при трансфузиях гемокомпонентов донорские антитела редко попадают в организм больного в большом количестве, и не все донорские антитела имеют клиническое значение. Кроме того, переливание крови от sensibilizированных доноров возможно, если у пациентов нет антигена, против которого направлены антитела донора. В этой связи для предотвращения гипердиагностики антител у доноров и исключения необоснованных отводов от донорства рекомендуется при редактировании нормативных документов о правилах проведения иммуногематологических исследований у доноров внести изменения, предусматривающие использование только анти-IgG реактивов (клиническое значение имеют только антитела класса IgG), обязательное определение специфичности антител, применение 2 образцов тест-эритроцитов и др.

Так, S. T. Nance подчеркивает, что в связи с ростом стоимости услуг здравоохранения следует выбирать методы определения антител осторожно, для того чтобы максимально повысить выявление клинически значимых антител и минимизировать клинически незначимых [16]. Для наибольшего снижения числа ошибок важна автоматизация, так как в автоматизированных методах, как правило, лучше осуществляется контроль процесса. Отбор специальных групп пациентов, которым показано определение антител в связи с несомненным риском аллоиммунизации, также будет способствовать контролю затрат в трансфузиологии. Другое направление в определении антиэритроцитарных антител – выявление этих антител у доноров. По мнению автора, выполнение такого теста позволяет устранить необходимость в «малом» тесте на совместимость (сыворотка донора против эритроцитов пациента), что делает предтрансфузионное исследование менее ресурсозатратным (меньше исследований) для больниц и дает возможность компьютерного определения совместимости для соответствующих больных.

G. Мену также ставит вопрос о значении определения клинической значимости аллоантител. Автор подчеркивает, что применяемые серологические методы не могут с абсолютной точностью предсказать, действительно ли переливание «несовместимой» по данным этих тестов крови приведет к тяжелым посттрансфузионным осложнениям, так как антитела крови реципиента, реагирующие *in vitro* с донорскими эритроцитами, могут не быть клинически значимыми *in vivo*. Не исключено, что в некоторых случаях это может привести к необоснованной задержке жизненно важной трансфузии у пациентов, которые нуждаются в постоянных переливаниях. В качестве дополнительного метода определения клинической значимости антител автор предлагает клеточную методику – исследование моноцитарного монослоя, которое может иметь особое значение, если в крови реципиента присутствуют антитела с «вариабельной»

клинической значимостью или антитела против широко распространенных антигенов, когда приходится заказывать кровь редких групп [17].

Важным показателем эффективности профилактических мероприятий по снижению риска посттрансфузионных осложнений является индекс аллоиммунизации населения (частота встречаемости аллоиммунных антител). Он неодинаков для разных регионов страны. Так, было установлено, что индекс аллоиммунизации для Кировской области в 2012 г. составил 0,64 % [18]. Среди гематологических больных частота встречаемости аллоантител в данном регионе была значительно выше – 2,4 %. По данным лечебно-профилактических учреждений г. Санкт-Петербурга, в 2013–2014 гг. индекс аллоиммунизации антиэритроцитарными антителами среди пациентов составлял 1–3,8 % [19, 20], при этом наиболее высоким процент sensibilizации был у гематологических больных, нуждающихся в многократных гемотрансфузиях. По данным тех же авторов, наиболее часто встречались антитела анти-D, что еще раз подтверждает значение антигена D как наиболее трансфузионно опасного антигена системы резус. Из моноспецифических антител были обнаружены также антитела анти-E, анти-C, анти-c. В целом эти данные, по-видимому, соответствуют наиболее современной шкале приоритета трансфузионно опасных антигенов эритроцитов: D>K>E>c>C<sup>w</sup>>C>e [21]. Следует отметить появление антител 2 и более специфичностей – анти-D+C, анти-D+E, анти-D+C+E, а также полиспецифических антител к разным антигенным системам – анти-D+C+K, анти-D+K, анти-E+K и др. [20].

В разных странах продолжают исследования особенностей распределения групповых факторов крови среди населения с целью составления геногеографической карты соответствующих стран. Например, в иракской провинции Аль-Наджаф было установлено такое распределение групп крови системы АВ0 [22]: 0(I) – 39,7 %, А(II) – 26,5 %, В(III) – 24,4 %, АВ(IV) – 9,4 %. Соотношение между резус-положительными и резус-отрицательными людьми – 92,6 и 7,4 % соответственно. Аналогичные исследования проводились в штате Андхра-Прадеш в Индии [23]. Полученные результаты: 0(I) – 42 %, А(II) – 13 %, В(III) – 40 %, АВ(IV) – 5 %; D-положительные лица – 99 %, D-отрицательные – 1 %.

Проводятся такие работы и в ряде регионов Российской Федерации. Так, в Республике Татарстан в 2015 г. было установлено следующее распределение групп крови среди доноров [24]: 0(I) – 33,7 %, А(II) – 31,1 %, В(III) – 23,7 %, АВ(IV) – 11,5 %. При этом экстраагглютинины  $\alpha_1$  были обнаружены у 0,57 % доноров с группой А<sub>2</sub>(II) и 12,4 % доноров с группой А<sub>2</sub>В(IV). Резус-положительных доноров было 87,4 % (включая доноров с резус-фенотипами Ccddee, ccddEe и доноров с антигеном D<sup>u</sup>), резус-отрицательных – 12,6 %.

Таким образом, исследования антигенов и антител важнейших антигенных систем эритроцитов продолжают по различным направлениям, что будет способствовать повышению эффективности профилактики посттрансфузионных реакций и осложнений. Прежде всего необходимо отметить, что в настоящее время на качественно новый уровень поднимается решение проблемы тестирования групп крови различных антигенных систем эритроцитов у доноров и реципиентов. Наряду с сохраняющими значение классическими иммуногематологическими методами осуществляется все более широкое внедрение молекулярных методов определения групповых факторов крови – методов полимеразной цепной реакции (ПЦР), т.е. скрининга молекул ДНК на наличие генов, кодирующих те или иные групповые антигены эритроцитов.

В наиболее ранних публикациях, посвященных молекулярным методам определения групп крови, рассматривались вопросы развития и применения этих методов. W.A. Flegel и соавт. [25] в 1998 г. отмечали, что с начала применения в 1993 г. типирования антигенов системы резус по ДНК этот метод внедрен в практику пренатального типирования, в том числе для скрининга и первичной характеристики парциального D. Авторы рекомендовали включение в генетическое типирование исследования различных полиморфизмов и отмечали важность поиска подходов к постепенному повышению надежности и экономической эффективности типирования групп крови молекулярными методами. При этом авторы считали возможным, что при определенных условиях генетическое типирование может заменить превалирующие ныне серологические методы даже во многих рутинных исследованиях. Подчеркивалось, что трансфузионная медицина имеет уникальную возможность использовать максимально широкую базу данных фенотипов для проверки и развития молекулярных методик.

Уже значительно позже, в 2006 г., в литературном обзоре W.A. Flegel [26] отмечал, что за последние 5 лет произошел переход от создания базовой молекулярно-генетической техники к внедрению молекулярно-генетических исследований в клиническую практику. К тому времени было обнаружено более 150 аллелей одного только гена *RHD*. Кодированные данными аллелями антигены классифицированы по антигенным и клиническим особенностям как определенные фенотипы – парциальный D, слабый D и DEL. Эти разнообразные аллели широко варьируют среди человеческих популяций, что представляет ценность для трансфузиологии. Автор подчеркнул, что генетическая диагностика групповых антигенов эритроцитов обеспечит экономически выгодное развитие трансфузионной медицины.

Важное значение в работах по генотипированию антигенных систем эритроцитов имеет изучение

возможности его применения для точного определения групповых факторов крови у пациентов, перенесших множественные гемотрансфузии, и установление в таких случаях преимущества данного метода перед серологическими методиками.

R.E. Wenk, F.A. Chiafari [27] в 1999 г. сообщили о предварительных работах, посвященных проверке возможности типирования ДНК у реципиентов после массивной гемотрансфузии. У ограниченного числа взрослых реципиентов, перенесших массивные трансфузии с содержащими лейкоциты компонентами крови, были проведены претрансфузионные и посттрансфузионные типирования ДНК методами Саузерн-блоттинга и ПЦР. Во всех исследованиях соответствующие данные оказались идентичными. Это позволило предположить, что некоторые ДНК-методы могут обеспечить надежное типирование у взрослых реципиентов после массивной трансфузии.

В 2000 г. T.G. Legler и соавт. [28] провели сравнительный анализ генотипирования резус-принадлежности и данных серологического определения резус-фенотипа в группе больных, нуждающихся в постоянных пожизненных трансфузиях. В 2 случаях D-отрицательные по серологическим тестам пациенты генотипически оказались D-положительными; 4 пациента, серологически имевшие фенотип Cc, генотипически были гомозиготными по C (C/C); 1 реципиент серологически имел фенотип ee, а генотипически – E/e. Авторы отметили, что у больных с постоянными трансфузиями серологическое определение групп крови может быть невозможно или ненадежно из-за ложноположительной агглютинации. Таким образом, генетическое исследование обеспечило правильный результат.

В том же году P. Rozman и соавт. [29] провели анализ образцов крови до и после переливания у пациентов, недавно перенесших многочисленные гемотрансфузии. Применялось генотипирование ДНК методом ПЦР с использованием содержащих специфическую последовательность праймеров, которое позволяло одновременно и быстро определять группы систем ABO, резус, Келл, Кидд и Даффи. Серологическими методами в крови пациентов были обнаружены смешанные популяции эритроцитов с разными группами крови (химеризм). Генотипирование периферической крови позволило во всех случаях получить результаты, идентичные аутологичному фенотипу групп крови, независимо от объема перелитой крови и времени после трансфузии. Таким образом, было показано, что ПЦР позволяет быстро и надежно определять аутологичные группы крови систем ABO, резус, Келл, Кидд и Даффи, даже если больной недавно перенес множественные трансфузии.

M.E. Reid и соавт. [30] также изучали возможность применения ПЦР с использованием ДНК, полученной из лейкоцитов пациентов, недавно перенесших гемотрансфузии, для установления группового антигенного профиля данных пациентов. Чтобы устранить

проблемы, возникающие в связи с низким качеством ДНК, использовали праймеры, фиксирующиеся на флангах интересующего участка ДНК и реплицирующие соответствующий короткий ПЦР-ампликон. Было установлено, что во всех случаях молекулярный анализ соответствовал результатам фенотипирования. Таким образом, авторы тоже доказали, что ПЦР обеспечивает надежное определение аллелей, кодирующих групповые факторы крови.

Н. Kroll и соавт. организовали массовую исследовательскую работу по генотипированию самых значимых антигенов тромбоцитов, гранулоцитов и эритроцитов [31], в которой участвовали 33 института из Германии, Австрии и Швейцарии. Что касается исследований эритроцитов, то 12 лабораторий типировали наиболее распространенные антигены систем АВ0 и резус и еще 4 лаборатории ограничились типированием гена *RHD*. Применяли в основном метод ПЦР с содержащими специфическую последовательность праймерами, а также анализ фрагментов ограниченной длины, олигонуклеотид-лигазную пробу и др. При этом ошибки в определении группы крови системы АВ0 были допущены в 5,2 % случаев, резус-фенотипа – в 0,3 % случаев. Работа продемонстрировала существование различных надежных техник генотипирования аллоантигенов клеток крови и высокие стандарты деятельности участвующих лабораторий. Однако частота ошибок при определении группы крови системы АВ0 в 5,2 % показала, что необходимы дальнейшие усилия, чтобы повысить точность генотипических методик. По заключению авторов, будущие исследования должны будут подбирать методы и участников с редкими вариантами генов, кодирующих антигены эритроцитов, чтобы гарантировать надежность генотипирования, в том числе в пренатальной диагностике несовместимости матери и плода.

D.J. Anstee [32], подчеркивая ценность методов генотипирования групп крови, основанных на анализе ДНК, в то же время отмечает, что в перспективе молекулярная диагностика не сможет полностью заменить рутинные серологические методы определения групповых факторов. Сохранят свое значение также серологические методы выявления и идентификации клинически значимых антиэритроцитарных антител. Теоретически возможно определение генотипов донора и реципиента электронным методом с применением генчиповой технологии. Однако эти методы достаточно сложны, и, кроме того, нереалистично полагать, что донорская кровь, имеющаяся в наличии в какой-либо определенный момент времени, может быть протипирована для всех пациентов по всем трансфузионно опасным антигенам. Тем не менее, подчеркивает автор, расширенное (не только по АВ0 и резус) генотипирование компонентов крови для реципиентов с предсуществующими антителами и с несомненной предрасположенностью к аллоиммунизации уже

широко применяется как рутинное исследование. Совместное использование основанной на ДНК-анализе методологии и серологических методов улучшит обеспечение широко фенотипированной донорской кровью пациентов, в том числе с аллоантителами.

М.Е. Reid [33] также отмечает, что классические гемагглютинационные методы определения групповых антигенов эритроцитов имеют определенные ограничения, часть из которых может быть устранена тестированием ДНК. При этом данные тесты позволяют сохранить антитела для подтверждения установленной антиген-негативности. Доказана эффективность генотипирования для определения важных антигенов различных систем. Но типирование ДНК не может сравниться по простоте с серологическими методами. Поэтому, по мнению автора, генотипирование не показано для рутинного скрининга, но небольшим контингентам больных с антителами к определенным антигенам оно может обеспечить дополнительную безопасность и эффективность гемотрансфузий. Имеет несомненную ценность типирование так называемых «минорных» антигенов в относительно небольших группах пациентов, у которых в плазме присутствуют аллоантитела к определенным комбинациям таких антигенов или у которых потенциально возможен иммунный ответ.

В 2015 г. Е.А. Scharberg и соавт. [34] в отношении серологических методов тестирования антигенов эритроцитов отмечали, что отсутствуют сертифицированные коммерческие реактивы для определения некоторых антигенов. Поскольку возможны ложноотрицательные реакции со слабыми или парциальными вариантами антигенов, типирование крови доноров требует более чувствительных методик и реагентов. В последние 10 лет молекулярное ДНК-типирование аллелей групп крови становится применимым для рутинного скрининга. Устанавливая генотипы, это исследование дает необходимую информацию, чтобы предугадать фенотип по антигенам эритроцитов, когда серологическое тестирование невозможно вследствие ограниченности в наличии реагентов или у пациентов, перенесших трансфузии.

В настоящее время вопрос о роли генотипирования групп крови у пациентов, постоянно нуждающихся в гемотрансфузиях, сохраняет актуальность. S.M. Vakanay и соавт. [35] с учетом того, что результаты серологических исследований групповых факторов разных антигенных систем эритроцитов могут оказаться ошибочными из-за предшествующих многократных трансфузий вследствие появления кровяных химер, провели сравнительный анализ данных фенотипирования и генотипирования групп крови у ряда больных с заболеваниями, требующими постоянных трансфузий (талассемия и др.). У 51 % обследованных были обнаружены расхождения между результатами фено- и генотипирования, причем в большинстве случаев эти расхождения потенциально могли привести к аллоиммунизации пациентов. Так, 5 человек,

у которых был определен фенотип Сс, оказались на самом деле гомозиготными по С, 2 пациента, фенотипированные как гомозиготные по антигену е, оказались гомозиготными по антигену Е. Кроме того, у 2 человек, фенотипически Келл-отрицательных, генотипически была установлена гетерозиготность по антигену К, что повысило шансы на нахождение необходимых доноров эритроцитов. Авторы делают вывод, что генотипирование групп крови жизненно важно для нуждающихся в постоянных трансфузиях пациентов, особенно если реципиенты не были фенотипированы перед началом первичной гемотрансфузии.

В некоторых работах рассматриваются и другие аспекты обеспечения безопасности гемотрансфузий с помощью генотипирования групповых антигенов эритроцитов. S.T. Chou и соавт. [36] изучали эффективность проверки на совместимость донорской крови по антигенам систем резус и Келл у больных с серповидно-клеточной анемией при переливании им крови от доноров-афроамериканцев. Было установлено, что у значительного числа пациентов выработались антитела против антигенов, по которым их эритроциты были фенотипически положительными. Этот феномен позволил объяснить высокочувствительное генотипирование по системе резус, которое выявило в таких случаях различные варианты аллелей, т. е. аллоиммунизация была обусловлена существованием парциальных антигенов системы резус. Авторы считают необходимым изучить возможность снижения риска аллоиммунизации путем генотипирования пациентов и некоторой (небольшой) части доноров.

Типирование групп крови по ДНК применяется и в акушерской практике. A. Goosh и соавт. [37] представили новую инструкцию по определению групп крови и тестированию антител при беременности. В инструкции, в частности, определяются показания для генотипирования плода. Такими показаниями являются: высокая концентрация клинически значимых антител в крови матери, наличие в анамнезе гемолитической болезни новорожденных и гетерозиготность отца по важным антигенам. Отмечается, что до недавнего времени для получения ДНК плода, необходимой для ПЦР, применяли инвазивные методы — амниоцентез или пробу на хориональные ворсины. Но эти процедуры несут некоторый, хотя и небольшой, риск спонтанного выкидыша и могут повысить активность материнских антител. В настоящее время создана новая техника точного определения D-генотипа плода, основанная на получении ДНК плода, циркулирующей в материнской периферической плазме. Предполагается, что в дальнейшем важное значение будет иметь внедрение массового типирования ДНК плода из материнской крови, и это широкомасштабное исследование станет возможным в недалеком будущем. Разрабатываются также методики генотипирования плода по антигенам с и К.

Еще один аспект генетического исследования групп крови — вопрос экономической эффективности этих методов и, как следствие, необходимость их применения во всех случаях гемотрансфузий. M.S. Karafin и соавт. [38] отмечают, что совершенствование и расширенное использование молекулярного генотипирования донорских эритроцитов повышают эффективность обеспечения антигенной совместимости при трансфузиях. С каждым годом методы молекулярного типирования обходятся для пациентов все дешевле и уже способны выявлять за одно исследование больше антигенов эритроцитов, чем существующие стандартные серологические методы. Возражая на это, S. Kasker и соавт. [39] утверждают, что, хотя молекулярное генотипирование действительно становится все более дешевым и широко применяемым, но при существующей ограниченности ресурсов даже эффективные и широко распространенные тестовые методы вряд ли смогут решить базовую проблему нехватки совместимой крови, поэтому анализ ДНК обязательно применять во всех случаях, чтобы не удорожать исследование. Вероятно, пока этот вопрос остается дискуссионным.

С предыдущими темами связана проблема рационального использования имеющейся донорской крови. J. Curvers и соавт. [40] описывают случай генотипирования группы крови и резус-фактора (D) у пациентки с множественными травмами. Ввиду экстренной ситуации первоначально переливание крови было проведено на месте дорожно-транспортного происшествия без определения группы крови пострадавшей, поэтому ей было перелито несколько доз эритроцитов 0(I)D—. После массивной гемотрансфузии определить группы крови пациентки серологическими методами оказалось невозможно. Тогда ей было выполнено генотипирование в ПЦР, благодаря чему было установлено, что у потерпевшей кровь A(II)D— (гетерозиготность — 0IAI). Поэтому в дальнейшем пациентке переливали донорские эритроциты A(II)D—. Таким образом, данный случай демонстрирует, как генотипирование групп крови позволяет уменьшить применение в острой ситуации донорской крови 0(I)D—, когда это не является необходимым.

Продолжается совершенствование методов генотипирования групп крови различных антигенных систем эритроцитов. E.S. Rodrigues и соавт. [41] предложили для быстрого и надежного генотипирования групп крови систем резус, MNS, Кидд и Даффи у пациентов с многократными гемотрансфузиями оптимизированную распознающую аллели в реальном времени ПЦР. Применение серологических методов определения групповых факторов крови имеет ограничения, например, у недавно перенесших трансфузии больных (химеризм) и у больных с положительным прямым антиглобулиновым тестом. Результаты ПЦР не зависят ни от циркулирующих эритроцитов донора, ни от аутоиммунных антител. Изученный

авторами метод ПЦР позволяет определять разные аллели генотипов, кодирующих антигенные системы. По сравнению с конвенциональной ПЦР данный метод более чувствителен, т.е. позволяет работать с меньшими количествами ДНК. Эта разновидность ПЦР обеспечивает лучшую воспроизводимость результатов, быструю (через несколько часов после экстракции ДНК) и точную молекулярную диагностику и значительное удешевление исследований (в том числе за счет использования меньшего количества реагентов). ПЦР в реальном времени имеет большой потенциал для автоматизации методов генотипирования групп крови эритроцитарных систем.

Итак, приведенные данные публикаций охватывают различные аспекты генетического определения групп крови эритроцитарных систем у доноров и реципиентов и отражают растущую роль молекулярной диагностики в практической трансфузиологии.

**Цель работы** – проверить возможность идентификации групп крови у гематологических пациентов после многочисленных гемотрансфузий.

**Материалы и методы**

Образцы крови, взятые на коагулянтах – цитрате или ЭДТА, были серологически типированы на антигены А и В, Rh D, Rh C/c, Rh E/e с применением моноклональных антител анти-А, анти-В, анти-D, анти-С, анти-С<sup>w</sup>, анти-с, анти-Е и анти-е (Моabs) («Гематолог», Россия). Гемагглютинационное типирование в гелевых колонках ID-Cards (DiaClon ABO/D+Reverse Grouping и DiaClon Rh-subgroups+K) было использовано для подтверждения химеризма у больных после переливания: агглютинированные клетки формировали красную линию на поверхности геля, а неагглютинированные образовывали «пуговку» на дне микротубы. Экстракт ДНК исследовали

Таблица 1. Генотипирование групп крови ABO у больных с химеризмом  
Table 1. Genotyping of ABO blood groups in patients with chimerism

Химеризм, % Chimerism, %		Генотипирование Genotyping
с анти-А with anti-A	с анти-В with anti-B	
50	50	B1B1 (нет α) B1B1 (no α)
50	100	A1B1

с помощью коммерческих наборов PCR-SSP с праймерами для типирования ABO, RHD и RHCE (BAG, Germany).

**Результаты**

В 2015 г. авторы серологически типировали образцы крови 2055 гематологических пациентов, русских по происхождению. Проблемы с определением групп крови по системе ABO, связанные с посттрансфузионным химеризмом, были обнаружены у 32 первичных больных (1,6 %), по системе резус – у 64 первичных больных (3,2 %). От 24 пациентов было получено информированное согласие на генотипирование. Все пациенты страдали от идиопатической или симптоматической цитопении либо изолированной анемии (апластическая анемия – 5, различные формы острых лейкозов – 3, миелодиспластический синдром – 4, множественная миелома – 2, β-талассемия – 1, постгерпетическая невралгия – 1, анемия неясного генеза – 6, парциальная красноклеточная аплазия – 1, с трансплантированной почкой – 1) и перенесли трансфузии перед госпитализацией в ГНЦ. Проблемы с определением группы крови ABO были у 2 пациентов: у 1 был выявлен 50 % химеризм с моноклонами анти-А

Табл. 2. Химеризм и результаты генотипирования

Table 2. Chimerism and genotyping results

Число больных, n Number of patients, n	Химеризм по антигенам системы резус, % Chimerism in the Rh system antigens, %						Генотипирование Genotyping	
	a-D	a-C	a-c	a-Cw	a-E	a-e	Результат Results	Число угаданных результатов + химеризм, абс. (%) Number of guessed results + chimerism, total (%)
17		40–90					RHCExC	5 (20–95)
13			50–90				RHCExc	9 (40–90)
3				5–50			RHCExCw	2 (5)
4	20–90						RHD	3 (20–90)
18					30–90		RHCExE	9 (30–90)
7						50–95	RHCExe	3 (95)

и анти-В, у другого было 50 % неагглютинированных эритроцитов с анти-А. При генотипировании у этих больных установлены соответственно В1В1 и А1В1 (табл. 1). У 24 гематологических больных не удалось определить резус-фенотип: RhC – у 17 (присутствие агглютинированных эритроцитов – 40–90 %), Rhc – у 13 (50–90 %), RhD – у 4 (20–90 %), RhE – у 18 (30–90 %), Rhe – у 7 (50–95 %), RhC<sup>w</sup> – у 3 (5–50 %) (табл. 2). Таким образом, посттрансфузионный химеризм по 1 антигену системы резус был обнаружен у 5 гематологических больных, по 2 – у 7 больных, по 3, 4 и 5 антигенам – соответственно у 6, 5 и 1 больного (табл. 3). Наличие антигена RhC<sup>w</sup> было подтверждено у 2 пациентов с 50 % химеризмом по RhC<sup>w</sup> путем генотипирования. Молекулярным методом было установлено присутствие антигена RhC у 5 гематологических пациентов с химеризмом (от 20 до 95 %), наличие антигена Rhc – у 9 больных (40 % до 90 %), RhD – у 3 (20 % до 90 %), RhE – у 9 (от 30 до 90 %) и Rhe – у 3 пациентов с химеризмом 95 %. Мониторинг групп крови у всех гематологических больных через 4 мес после прекращения эритроцитсодержащих трансфузий подтвердил фенотипы, предсказанные генотипированием.

#### Заключение

Определение группы крови АВ0 и резус-фенотипа очень важно для ранее перенесших трансфузии

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Таблица 3.** Количество антигенов системы резус, по которому у обследованных больных (N = 24) обнаружен посттрансфузионный химеризм

Table 3. The number of Rhesus system antigens on which in patients (N = 24) posttransfusion chimerism is detected

Количество антигенов системы резус The number of Rh system antigens	Число больных с посттрансфузионным химеризмом, n Number of patients with posttransfusion chimerism, n
1	5
2	7
3	6
4	5
5	1

пациентов и для пациентов с выявленными иррегулярными антителами. Генотипирование групп крови нашло применение в трансфузиологической медицине и позволяет предотвратить аллоиммунизацию к наиболее клинически значимым групповым антигенам эритроцитов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Донсков С.И., Гапонова Т.В. Иммунологическая безопасность переливания эритроцитов (развитие концепции). Вестник службы крови России 2013;2:1–9 [Donskov S.I., Gaponova T.V. Immunological safety of red blood cell transfusions (concept development). Vestnik sluzhby krovi Rossii = Bulletin of Russia Blood Service 2013;2:1–9 (In Russ.)].
- Chiaroni J., Legrand D., Dettori I. et al. Analysis of ABO discrepancies occurring in 35 French hospitals. Transfusion 2004;44:860–3. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.03337.x.
- Migeot V., Ingrand I., Salmi R.L. et al. Reliability of bedside ABO testing before transfusion. Transfusion 2002;42:1348–55. PMID: 12423520.
- Жибурт Е.Б., Шестаков Е.А., Караваев А.В. и др. Стратегия безопасности переливания крови. Гематология и трансфузиология 2012;57(3):10. [Zhiburt E.B., Shestakov E.A., Karavaev A.V. et al. Strategy of blood transfusion safety. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2012;57(3):10 (In Russ.)].
- Shautskova L.Z., Shogenov Z.S. The Rhesus blood group system: analytical review. Modern problems of science and education 2015; Issues 2 (Part 1).
- Westhoff C.M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. Seminars in Hematology 2007;44(1):42–50. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2006.09.010.
- Flegel W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. Current Opinion in Hematology 2006;13(6):476–83. DOI: 10.1097/01.moh.0000245694.70135.c3.
- Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? Transfusion 2005;45(Issue 10): 1547–1551. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00625.x.
- Avent N.D., Finning K.M., Liu W. et al. Molecular biology of partial D phenotypes. Transfus Clin Biol 1996; 3(Issue 6):511–6. PMID: 9018818.
- Wagner F.F., Eicher N.I., Jorgensen J.R. et al. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. Blood 2002;100:2253–6. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0742.
- Silvy M., Simon S., Gouvisos J. et al. Weak D and DEL alleles detected by routine SNaPshot genotyping: identification of four novel RHD alleles. Transfusion 2011;51(2):401–11. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02830.x.
- Wagner T., Kormoczi G., Buchta C. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. Transfusion 2005;45: 520–6. DOI: 10.1111/j.0041-1132.2005.04256.x.
- Yasuda H., Ohto H., Sakuma S. et al. Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. Transfusion

- 2005;45(10):1581–4.  
DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00579.x.
14. Wagner F.F., Gasner C., Müller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385–93. PMID: 9864185.
  15. Минеева Н.В. Особенности исследования антител к антигенам эритроцитов у доноров. *Трансфузиология* 2013;13(3):14–20. [Mineeva N.V. Features of antibodies to erythrocyte antigens detection in donors. *Transfuziologiya = Transfusiology* 2013;13(3):14–20 (In Russ.)].
  16. Nance S.T. Red cell antibody detection by serology. *ISBT Science Series* 2015;10(Suppl. 1):1–4. DOI: 10.1111/voxs.12128.
  17. Meny G. Determining the clinical significance of alloantibodies. *ISBT Science Series* 2015;10(Suppl. 1):39–43. DOI: 10.1111/voxs.12124.
  18. Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Удальцова В.Ф. и др. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов у доноров компонентов крови и пациентов с заболеваниями системы крови. *Вестник службы крови* 2012;3:18–21. [Butina E.V., Zaytseva G.A., Udaltsova V.F. et al. Allosensitization to erythrocyte antigens in blood donors and patients with blood diseases. *Vestnik sluzhby krovi Rossii = Bulletin of Russia Blood Service* 2012;3:18–21 (In Russ.)].
  19. Минеева Н.В., Гавровская С.В., Кроби-нец И.И. и др. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями. *Онкогематология* 2013;4:13–7. [Mineeva N.V., Gavrovskaya S.V., Krobintets I.I. et al. Frequency of anti-erythrocyte, antileukocytic, antiplatelet alloantibodies in patients with hematological diseases. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2013;4:13–7 (In Russ.)].
  20. Минеева Н.В., Пашкова И.А. Специфичность антиэритроцитарных антител у больных многопрофильного стационара. *Трансфузиология* 2014;15(1):53–4. [Mineeva N.V., Pashkova I.A. Specificity of anti-erythrocyte antibodies in patients in multidisciplinary hospital. *Transfuziologiya = Transfusiology* 2014;15(1):53–4 (In Russ.)].
  21. Донсков С.И., Морокков В.А. Группы крови человека: Руководство по иммуносерологии. М., 2011. 1016 с.
  - [Donskov S.I., Morokov V.A. Human blood groups. Guide to immunoserology. Moscow, 2011. 1016 pp. (In Russ.)].
  22. Salah K.H., Alaa H.A. Normal distribution of ABO blood groups and Rhesus factor in Al-Najaf province. *European Journal of Experimental Biology* 2015;5(7):18–21.
  23. Prakash D.S., Varma P.J., Reddy S.G. et al. Genetic Variation of Blood Group Polymorphism among an Endogamous Human Population from Andhra Pradesh, India. *International Journal of Scientific Study* 2013;1(2):22–5. Available at: [http://www.ijss-sn.com/uploads/2/0/1/5/20153321/original\\_article\\_3.pdf](http://www.ijss-sn.com/uploads/2/0/1/5/20153321/original_article_3.pdf).
  24. Белопухов В.М., Тураев Р.Г., Бельская Е.Е. и др. Распределение групп крови среди доноров Республики Татарстан. *Казанский медицинский журнал* 2015;96(3):437–40. [Belopukhov V.M., Turaev R.G., Belskaya E.E. et al. Distribution of Blood Groups among the Donors of the Republic of Tatarstan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal* 2015;96(3):437–40 (In Russ.)]. DOI: 10.17750/KMJ2015-437.
  25. Flegel W.A., Wagner F.F., Muller T.H. et al. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfusion Medicine* 1998;8:281–302. PMID: 9881423.
  26. Flegel W.A. Molecular genetics of RH and its clinical application. *Transfus Clin Biol* 2006;13:4–12. DOI: 10.1016/j.tracbi.2006.02.011.
  27. Wenk R.E., Chifari F.A. DNA typing of recipient blood after massive transfusion. *Transfusion* 1997;37:1108–10. PMID: 9426631.
  28. Legler T.G., Eber S.W., Lakomek M. et al. Application of RHD and RHCE genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. *Transfusion* 1999;39:852–5. PMID: 10504121.
  29. Rozman P., Dovc T., Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, Jk and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000;40:936–42. PMID: 10960520.
  30. Reid M.E., Rios M., Powell V.I. et al. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000;40:48–53. PMID: 10644811.
  31. Kroll H., Carl B., Santoso S. et al. Workshop Report on the Genotyping of Blood Cell Alloantigens. *Transfusion Medicine* 2001;11:211–9. PMID: 11422952.
  32. Anstee D.J. Red cell genotyping and future of pretransfusion testing. *Blood* 2009;114(2):248–56. DOI: 10.1182/blood-2008-11-146860.
  33. Reid M.E. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology* 2009;1:171–7. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.171.
  34. Scharberg E.A., Richter E., Bugert P. Red cell antigen testing. *ISBT Science Series* 2015;10(1):5–11. DOI: 10.1111/voxs.12134.
  35. Bakanay S.M., Ozturk A., Ileri T. et al. Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfusion and Apheresis Science* 2013;48:257–61. DOI: 10.1016/j.transci.2013.01.009.
  36. Chou S.T., Jackson T., Vege S. et al. High prevalence of red cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013;122(6):1062–71. DOI: 10.1182/blood-2013-03-490623.
  37. Gooch A., Parker J., Wray J. et al. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *Transfusion Medicine* 2007;17:252–62. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2007.00767.x.
  38. Karafin M.S., Denomme G.A., Bryant B.J. The future of red blood cell alloimmunization risk reduction. *Transfusion* 2015;55:220–1. DOI: 10.1111/trf.12863.
  39. Kacker S., Ness P.M., Sue Shirey R. The future of red blood cell alloimmunization risk reduction. *Transfusion* 2015;55:222–3. DOI: 10.1111/trf.12866.
  40. Curvers J., Scharnhorst V., de Haas M. et al. Blood group genotyping in a multitrauma patient: a case report. *Immuno-hematology* 2012;28(3):85–7. PMID: 23286553.
  41. Rodrigues E.S. et al. Rapid blood group genotyping by allelic discriminative real-time PCR in multiply transfused patients. *Transfusion Medicine* 2015;1–4. DOI: 10.1111/tme.12186.

## Роль и место проточной цитометрии в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при множественной миеломе

И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, У.Л. Джулакян, Л.П. Менделеева

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Гальцева Ирина Владимировна [irinagaltseva@gmail.com](mailto:irinagaltseva@gmail.com)

За последние 20 лет подходы к терапии множественной миеломы претерпели значительные изменения, и частота достижения ремиссии заболевания увеличилась. Использование новых диагностических методов позволило более достоверно оценивать ответ на терапию и прогнозировать возникновение рецидива: аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, секвенирование нового поколения, многоцветная проточная цитометрия позволяют обнаруживать минимальную остаточную болезнь (МОБ) с чувствительностью от  $10^{-5}$  до  $10^{-6}$ . Оценка МОБ с помощью проточной цитометрии – динамично развивающееся направление исследований. Задачами многоцентровых исследований, использующих проточную цитометрию в качестве инструмента для поиска МОБ при множественной миеломе, являются стандартизация, увеличение чувствительности и специфичности данного метода. Цель публикации – представление данных о методах, применяющихся для мониторинга МОБ и достижений в области проточной цитометрии.

**Ключевые слова:** множественная миелома, иммунофенотипирование, проточная цитометрия, минимальная остаточная болезнь

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-80-94

### Flow cytometry in the diagnosis and monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma

I.V. Galtseva, Y.O. Davydova, N.M. Kapranov, U.L. Julakyan, L.P. Mendeleeva

Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Noviy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Over the past 20 years, approaches to the therapy of multiple myeloma have undergone significant changes, and frequency of achieving remission of the disease increased. The new diagnostic methods allowed evaluating the more deep therapy response and predicting the relapse: allele-specific polymerase chain reaction, next generation sequencing, multicolor flow cytometry may detect a minimal residual disease (MRD) with a sensitivity of  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$ . Evaluation of MRD by flow cytometry is a dynamically developing direction of research. The aim of multicenter investigations using flow cytometry for MRD-searching in multiple myeloma is standardization, increasing the sensitivity and specificity of this method. The article presents data on the methods used in monitoring MRD, as well as advances in flow cytometry.

**Keywords:** multiple myeloma, immunophenotyping, flow cytometry, minimal residual disease

#### Введение

Множественная миелома (ММ) – злокачественное заболевание, характеризующееся клональной пролиферацией в костном мозге (реже в экстрамедуллярных очагах) аномальных плазматических клеток (ПК), которые секретируют моноклональный протеин (М-протеин) в форме иммуноглобулинов IgG, -А, -D и -E и / или их моноклональные κ и λ свободные легкие цепи (СЛЦ). Частота встречаемости ММ, по данным 2013 г., составляет 0,8 % от всех случаев заболевания злокачественными новообразованиями [1], более 10 % от случаев гемобластозов [2] и, по разным данным, 3,5–6 случаев на 100 тыс. населения в год [3].

Согласно классификации лимфопролиферативных заболеваний Всемирной организации здравоохранения (пересмотра 2008 г.), необходимыми критериями для диагностики ММ являются: наличие

М-протеина в сыворотке и / или моче, пролиферация в костном мозге (КМ) моноклональных ПК или наличие плазмцитомы, а также повреждение органов и тканей. В 2014 г. международной рабочей группой по ММ (International Myeloma Working Group, IMWG) были пересмотрены критерии для установления диагноза ММ и дифференциальной диагностики между ММ и другими заболеваниями, связанными с клональной пролиферацией ПК [4] (табл. 1).

За последние 20 лет быстро развивались новые подходы к лечению ММ. Появление и применение современных лекарственных средств, «направленных» противоопухолевых агентов, введение трансплантации аутологичных стволовых клеток крови (аутоТСКК) вызвали проведение многочисленных мультицентровых интернациональных клинических исследований. Новые подходы в терапии диктовали необходимость в универсальной системе критериев оценки ответа

**Таблица 1.** Диагностические критерии множественной миеломы и других заболеваний, связанных с клональной пролиферацией плазматических клеток, предложенные международной рабочей группой по множественной миеломе (IMGW), 2014 г.

**Table 1.** Diagnostic criteria for multiple myeloma and other diseases associated with clonal plasma cells proliferation, proposed by the international multiple myeloma working group (IMGW), 2014

Заболевание Disease	Критерии Criteria
<p>Не-IgM – моноклональная гаммапатия неясного генеза</p> <p>Non-IgM monoclonal gammopathy of unknown origin</p>	<p>Соответствие <b>всем</b> критериям:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наличие М-протеина (не IgM) в сыворотке менее 30 г/л.</li> <li>• Уровень клональных плазматических клеток (ПК) в костном мозге (КМ) менее 10 %.</li> <li>• Отсутствие CRAB-симптомов: гиперкальциемии, почечной недостаточности, анемии и поражения костей</li> </ul> <p>All criteria required:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of M-protein (not IgM) in serum less than 30 g/L.</li> <li>• Clonal plasma cells (PC) in bone marrow (BM) less than 10 %.</li> <li>• Absence of CRAB-symptoms: hypercalcemia, renal failure, anemia and bone damage</li> </ul>
<p>Тлеущая (асимптоматическая) множественная миелома</p> <p>Asymptomatic multiple myeloma</p>	<p>Соответствие <b>всем</b> критериям:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наличие М-протеина (IgG или -A) в сыворотке не менее 30 г/л <b>или</b> моче не менее 500 мг/сут <b>и / или</b> в клональных ПК в КМ (10–60 %).</li> <li>• Отсутствие амилоидоза или признаков, определяющих миелому</li> </ul> <p>All criteria required:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of M-protein (IgG or IgA) in serum not less than 30g/L or in urine not less than 500 mg/day <b>and/or</b> clonal PC in BM (10–60 %).</li> <li>• Absence of amyloidosis or myeloma criteria</li> </ul>
<p>Множественная миелома</p> <p>Multiple myeloma</p>	<p>Соответствие <b>обоим</b> критериям:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Присутствие клональных ПК в КМ не менее 10 % либо подтвержденная биопсией костная или экстрамедуллярная плазмацитома.</li> <li>• Присутствие <b>хотя бы 1</b> из признаков, определяющих миелому:                         <ul style="list-style-type: none"> <li>□ CRAB-симптомы                                 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ гиперкальциемия: уровень сывороточного кальция более чем на 0,25 ммоль/л (&gt;10 мг/л) превышает верхнюю границу нормы <b>или</b> более 2,75 ммоль/л (&gt;110 мг/л),</li> <li>▪ почечная недостаточность: клиренс креатинина менее 40 мл/мин или уровень сывороточного креатинина более 177 мкмоль/л (&gt;20 мг/л),</li> <li>▪ анемия: уровень гемоглобина более чем на 20 г/л ниже предела нормы <b>или</b> менее 100г/л,</li> <li>▪ поражения костей: <b>1 или</b> более остеолитических повреждений по данным радиографии скелета, компьютерной томографии (КТ) или позитронно-эмиссионной томографии с компьютерной томографией;</li> </ul> </li> <li>□ клональных ПК в КМ не менее 60 %;</li> <li>□ соотношение вовлеченных сывороточных свободных легких цепей (СЛЦ) к невовлеченным СЛЦ не менее 100 (вовлеченных СЛЦ не менее 100 мг/л);</li> <li>□ более 1 очагового поражения (по крайней мере 5 мм) по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ)</li> </ul> </li> </ul> <p>Both criteria required:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clonal PC in the BM not less than 10 % <b>or</b> biopsy-proven bone or extramedullary plasmacytoma.</li> <li>• <b>At least 1</b> of the myeloma criteria:                         <ul style="list-style-type: none"> <li>□ CRAB-symptoms:                                 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hypercalcemia: the serum calcium level is more than 0.25 mmol/L (&gt;10 mg/L) above the upper normal limit (UNL) or more than 2.75 mmol/L (&gt;110 mg/L),</li> <li>▪ renal failure: creatinine clearance less than 40 ml/min or serum creatinine level more than 177 μmol/L (&gt;20 mg/L),</li> <li>▪ anemia: the hemoglobin level is more than 20 g/L below the norm limit or less than 100 g/L,</li> <li>▪ bone involvement: 1 or more osteolytic lesions from skeleton radiographs, computed tomography (CT), or positron emission tomography with computed tomography;</li> </ul> </li> <li>□ clonal PCs in BM not less than 60 %;</li> <li>□ the ratio of involved serum free light chains (FLC) to uninvolved FLC not less than 100 (involved FLC not less than 100 mg/L);</li> <li>□ more than 1 focal lesion (at least 5 mm) by magnetic resonance imaging (MRI)</li> </ul> </li> </ul>
<p>IgM – моноклональная гаммапатия неясного генеза</p> <p>IgM monoclonal gammopathy of unknown origin</p>	<p>Соответствие <b>всем</b> критериям:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Уровень моноклонального IgM в сыворотке менее 30 г/л.</li> <li>• Лимфоплазматическая инфильтрация КМ менее 10 %.</li> <li>• Отсутствие анемии, конституциональных симптомов, гипервязкости, лимфаденопатии или гепатоспленомегалии, которые могут свидетельствовать о наличии лимфопролиферативного заболевания</li> </ul> <p>All criteria required:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum monoclonal IgM level less than 30 g/L.</li> <li>• Lymphoplasmatic infiltration of BM less than 10 %.</li> <li>• Absence of anemia, constitutional symptoms, hyperviscosity, lymphadenopathy or hepatosplenomegaly, which may indicate the presence of lymphoproliferative disease</li> </ul>

Заболевание Disease	Критерии Criteria
Моноклональная гаммапатия неясного генеза легких цепей  Light chains monoclonal gammopathy of unknown origin	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ненормальное соотношение СЛЦ (&lt;0,26 или &gt;1,65).</li> <li>• Увеличение количества соответствующей вовлеченной легкой цепи (увеличение κ-СЛЦ при соотношении более 1,65, увеличение λ-СЛЦ при соотношении менее 0,26).</li> <li>• Отсутствие тяжелых цепей при иммунофиксации.</li> <li>• Отсутствие CRAB-симптомов.</li> <li>• Наличие клональных ПК в КМ менее 10 %.</li> <li>• Наличие М-протеина в моче менее 500 мг/сут</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>• The abnormal ratio of FLC (&lt;0.26 or &gt; 1.65).</li> <li>• Increase in the number of involved light chain (increase in κ-FLC at a ratio more than 1.65, increase in λ-FLC at a ratio more than 0.26).</li> <li>• Absence of heavy chains by immunofixation.</li> <li>• Absence of CRAB-symptoms.</li> <li>• Clonal PCs in BM less than 10 %.</li> <li>• M-protein in urine less than 500 mg/day</li> </ul>
Солидная плазмоцитома  Solid plasmacytoma	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наличие поражения костей или мягких тканей клональными ПК, доказанное с помощью биопсии.</li> <li>• Отсутствие клональных ПК в КМ.</li> <li>• Отсутствие других поражений костей (по данным МРТ или КТ) за исключением первичного очага.</li> <li>• Отсутствие CRAB-симптомов</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsy-proven bone or soft tissue lesion by clonal PCs</li> <li>• Absence of clonal PCs in BM</li> <li>• Absence of other bone lesions (according to MRI or CT scan) except for the primary focus</li> <li>• Absence of CRAB-symptoms</li> </ul>
Солидная плазмоцитома с минимальным вовлечением КМ  Solid plasmacytoma with minimal BM involvement	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наличие поражения костей или мягких тканей клональными ПК, доказанное с помощью биопсии.</li> <li>• Наличие клональных ПК в КМ менее 10 %*.</li> <li>• Отсутствие других поражений костей (по данным МРТ или КТ), за исключением первичного очага.</li> <li>• Отсутствие CRAB-симптомов</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsy-proven bone or soft tissue lesion by clonal PCs</li> <li>• Clonal PCs in BM less than 10 %*</li> <li>• Absence of other bone lesions (according to MRI or CT scan) except for the primary focus</li> <li>• Absence of CRAB-symptoms</li> </ul>

\*Если клональных ПК в КМ не менее 10 %, заболевание классифицируется как множественная миелома.

\*If clonal PC in BM not less than 10 %, the disease is classified as multiple myeloma.

на проводимую терапию, которую и разработала международная рабочая группа по миеломе в 2006 г., определив 4 глубины ремиссии по степени уменьшения количества клональных ПК в КМ, М-протеина в сыворотке и моче, изменению соотношения СЛЦ и сокращению размеров мягкотканых компонентов (табл. 2) [5]. Использование таких лекарственных препаратов, как талидомид, леналидомид и бортезомиб, и применение высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с последующей аутоТСКК позволили достичь значительного увеличения общей выживаемости (ОВ). Медиана ОВ в периоды с 1971 по 1996 г. и с 1996 по 2006 г. выросла с 29,9 до 44,8 мес [6], а в период с 2006 по 2010 г. достигла 6,1 года [7]. По данным

А. Palumbo и соавт. [8] и Р. Sonneveld и соавт. [9], ОВ составила более 80 % при использовании в терапии новых лекарственных препаратов и аутоТСКК. Лечение новыми препаратами привело к увеличению частоты достижения полной ремиссии (ПР) по сравнению с применением только ВДХТ с аутоТСКК даже у пациентов старше 65 лет и у пациентов с высоким риском и рефрактерным течением ММ. Однако, несмотря на достижение ПР в более чем 30 % случаев при ММ, у большей части пациентов развивается рецидив.

Стало очевидно, что понятий «полная ремиссия» и даже «строгая полная ремиссия» (сПР) (табл. 2) недостаточно для выделения групп пациентов с хорошим

**Таблица 2.** Категории ответа на терапию множественной миеломы в соответствии с данными международной рабочей группы по множественной миеломе в 2006 и 2011 гг.

**Table 2.** Categories of therapy response in multiple myeloma patients according to data of the international multiple myeloma working group in 2006–2011

Категория ответа (год) Categories of response ( year)	Критерии ответа Criteria of response
<p>Полная ремиссия (2006)</p> <p>Complete remission (2006)</p>	<p>Отрицательные данные по иммунофиксации сыворотки и мочи, <b>и</b> исчезновение мягкотканых компонентов/плазмодитом, <b>и</b> менее 5 % плазматических клеток в костном мозге (КМ)</p> <p>Negative immunofixation on the serum and urine <i>and</i> disappearance of any soft tissue plasmacytomas <i>and</i> less than 5 % plasma cells in bone marrow (BM)</p>
<p>Строгая полная ремиссия (2006)</p> <p>Stringent complete remission (2006)</p>	<p>К критериям полной ремиссии добавляются: нормальное соотношение свободных легких цепей (СЛЦ) <b>и</b> отсутствие клональных плазматических клеток (ПК), выявляемых методами иммуногистохимии или иммунофлюоресценции (2–4-цветной проточной цитометрией)</p> <p>Complete remission as defined above plus: normal free light chains (FLC) ratio <i>and</i> absence of clonal plasma cells (PC) by immunohistochemistry or immunofluorescence (2-4 color flow cytometry)</p>
<p>Очень хорошая частичная ремиссия (2006)</p> <p>Very good partial response (2006)</p>	<p>М-протеин, детектируемый в сыворотке или моче методом иммунофиксации, но не методом электрофореза, <b>или</b> редукция 90 % и более М-протеина в сыворотке и уровень М-протеина в моче менее 100 мг/сут</p> <p>Serum and urine M-protein detectable by immunofixation but not on electrophoresis <i>or</i> 90 % or greater reduction in serum M-protein plus urine M-protein less than 100 mg/day</p>
<p>Частичная ремиссия (2006)</p> <p>Partial response (2006)</p>	<p>Редукция М-протеина в сыворотке не менее 50 % и редукция М-протеина в суточной моче не менее 90 % или менее 200 мг/сут. Если М-протеин в сыворотке и моче неизмерим, то вместо критерия об уровне М-протеина используют критерий снижения не менее 50 % в разнице между уровнями вовлеченных и невовлеченных свободных легких цепей. Если неизмеримы ни М-протеин, ни СЛЦ, используют критерий редукции не менее 50 % ПК в КМ, если исходный уровень составлял не менее 30 %. В добавление к указанным критериям требуется сокращение не менее 50 % в размерах мягкотканых плазмодитов, если обнаруживались в дебюте</p> <p>Not less than 50 % reduction of serum M-protein and reduction in 24-h urinary M-protein by 90 % or to less than 200 mg/day.</p> <p>If the serum and urine M-protein are unmeasurable, a 50 % decrease in the difference between involved and uninvolved FLC levels is required in place of the M-protein criteria.</p> <p>If serum and urine M-protein are unmeasurable, and serum free light assay is also unmeasurable, 50 % reduction in PC in BM is required in place of M-protein, if baseline bone marrow plasma cell percentage was not less than 30 %.</p> <p>In addition to the above listed criteria, if present at baseline, a 50 % reduction in the size of soft tissue plasmacytomas is also required</p>
<p>Имунофенотипическая полная ремиссия (2011)</p> <p>Immunophenotypic complete remission (2011)</p>	<p>К критериям строгой полной ремиссии добавляется отсутствие фенотипически aberrантных (клональных) ПК среди не менее 1 млн проанализированных клеток костного мозга методом МПЦ (<math>\geq 4</math> маркеров)</p> <p>Stringent complete remission as defined above plus: Absence of phenotypically aberrant (clonal) PC among at least 1 million analyzed bone marrow cells by MFC method (<math>\geq 4</math> markers)</p>
<p>Молекулярная полная ремиссия (2011)</p> <p>Molecular complete remission (2011)</p>	<p>К критериям полной ремиссии добавляется негативный результат аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с чувствительностью <math>10^{-5}</math></p> <p>Complete remission as defined above plus: Negative result of allele-specific polymerase chain reaction with a sensitivity of <math>10^{-5}</math></p>

ответом на лечение и низким риском прогрессии заболевания. Появилась необходимость в более глубокой оценке полноты ремиссии.

Как известно, при лечении лейкозов (в частности, острого лимфобластного) глубина ответа на терапию оценивается с помощью высокочувствительных

методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многоцветная проточная цитометрия (МПЦ), позволяющих установить наличие остаточного опухолевого клона. Остаточная популяция аномальных клеток является причиной развития рецидива в дальнейшем, и это состояние называют минимальной

остаточной болезнью (МОБ). Оценка МОБ является важным критерием для установления глубины ремиссии, широко используется в клинической практике для стратификации на группы риска и прогноза. ММ не стала исключением. В 2011 г. в критерии для установления диагноза ММ и дифференциальной диагностики между ММ и другими заболеваниями международной рабочей группой по ММ были добавлены понятия иммунофенотипической и молекулярной ремиссии, которые устанавливаются по наличию МОБ методами МПЦ и аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) соответственно (табл. 2) [10].

#### **Методы детекции минимальной остаточной болезни и оценки полноты ремиссии при множественной миеломе и их сравнение**

##### **Морфологическое исследование пунктата костного мозга**

Морфологическое исследование КМ – наиболее распространенный метод определения опухолевой нагрузки при ММ. Одним из критериев ПР является наличие менее 5 % ПК в пунктате КМ. Морфологическое исследование должно проводиться в комплексе с иммунохимическими методами анализа.

В работе С. Сее и соавт. [11] было показано, что исследования уровня только СЛЦ недостаточно для установления ПР, так как у 10 % пациентов с нормальным соотношением СЛЦ в мазке КМ обнаруживалось более 5 % ПК. В группе из 92 пациентов с отрицательными данными (по результатам иммунохимического исследования) у 13 (14 %) пациентов в мазке пунктата КМ обнаруживалось более 5 % ПК. У них ОВ была значимо ниже, чем у пациентов, имеющих менее 5 % ПК в КМ (5,7 и 7,9 года соответственно).

##### **Иммунохимическое исследование сыворотки и мочи**

Измерение количества М-протеина, СЛЦ в сыворотке и моче с помощью методов электрофореза и иммунофиксации является доступным методом для диагностики и мониторинга ответа на лечение при ММ. За последнее десятилетие определение СЛЦ в сыворотке стало рутинным анализом. Соотношение СЛЦ является независимым прогностическим фактором на этапе диагностики ММ, позволяющим оценить агрессивное течение заболевания [12]. Однако оценка МОБ с помощью исследования количества СЛЦ не позволяет достоверно разделить пациентов на группы риска. Так, по данным J. Martínez-López и соавт. [13], из 94 пациентов с ПР 69 (73 %) больных достигли сПР, но достоверных различий по времени до прогрессии в группах ПР и сПР выявлено не было (медиана 53 и 62 мес для групп с ПР и сПР соответственно). Аналогичные данные были получены и в исследовании L. Lopez-Anglada и соавт. [14], в которое были включены 130 пациентов.

В исследовании В. Раiva и соавт. [15] показано, что среди 260 пациентов с ММ, проходивших терапию по протоколу GEM05>65y, 43 % достигли ПР, 30 % –

сПР и 30 % – иммунофенотипической ремиссии (ИР). При этом не было значимых различий в показателях выживаемости среди пациентов с ПР и сПР, однако у пациентов с ИР отмечались более длительные безрецидивная выживаемость (БРВ) и время до прогрессии заболевания в сравнении с пациентами как с ПР, так и с сПР. Кроме того, у части пациентов с ИР сохранялись положительные результаты иммунофиксации, но в последующем М-протеин у этих пациентов не определялся.

Среди пациентов с позитивным статусом МОБ были больные в периоде ПР (отрицательные результаты исследования методом иммунофиксации), у которых в дальнейшем обнаруживалось повторное возникновение М-протеина в ранние сроки после терапии (медиана – 3 мес). Аналогичная ситуация была у пациентов в периоде сПР, но с позитивным статусом МОБ, у которых прогрессия заболевания регистрировалась через 13 мес после индукционной терапии [15].

##### **Цитогенетическое исследование**

Наиболее значимыми независимыми параметрами, влияющими на время до прогрессии заболевания и ОВ, являются цитогенетические аберрации, выявленные с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), наличие ИР и возраст пациентов до 60 лет [16].

Найденные в дебюте заболевания хромосомные поломки определяют риск ММ. Минимальный набор для определения прогноза заболевания с помощью метода FISH включает транслокации t(4;14)(p16; q32), t(14;16)(q32; q23) и делецию del17p13 с частотой встречаемости 13 %, 3 % и 12 % соответственно. Расширенное исследование включает также транслокацию t(11;14)(q13;32) (частота 15 %), делецию del13q (частота 46 %), аномалии хромосомы 1, например gain1q (частота 38 %) [17]. К высокому риску ММ относятся t(4;14), t(14;16) или del(17p), остальные хромосомные аномалии определяют стандартный цитогенетический риск [18].

Выявление МОБ с помощью FISH-исследования имеет свои ограничения в связи с малым количеством остаточных ПК, оставшихся после терапии, и недостаточно высокой чувствительностью метода FISH ( $10^{-2}$ – $10^{-3}$ ), которая только на порядок выше чувствительности морфологического исследования ( $10^{-1}$ ).

##### **Аллель-специфичная полимеразная цепная реакция**

В основе метода лежит выявление клона опухолевых ПК посредством детекции специфической перестройки варибельного региона генов иммуноглобулина. При нормальном созревании В-клетки происходит реаранжировка сегментов V, D и J в комплексе генов Ig (*IgH*, *IgK* и *IgL*), которые кодируют множество варибельных доменов молекул иммуноглобулинов. Случайные инсерции и делеции в местах слияний V (D) J-сегментов создают крайне высокое разнообразие регионов, специфичных для каждой

В-клетки, в том числе и опухолевой. Эти регионы слияния, идентифицируемые в миеломных клетках каждого пациента, используются как опухолеспецифичные мишени для проектирования аллель-специфичных (или пациент-специфичных) праймеров. С 1990-х годов для детекции клональных перестроек применялась гнездовая ПЦР и позднее количественная ПЦР в режиме реального времени.

Недостатками АС-ПЦР являются технические сложности и невозможность применения метода в ряде лабораторий. В работе N. Puig и соавт. [19] АС-ПЦР была применима лишь в 42 % случаев при ММ, хотя в работе M. Sarasquete и соавт. [20] – в 75 % случаев. Однако при ряде модификаций, описанных в исследовании R. Silvennoinen и соавт., применимость АС-ПЦР достигла 100 % [21]. Кроме того, молекулярные методы не учитывают генетическую гетерогенность и клональную селекцию, которая может привести к элиминации субварианта клона в процессе лечения заболевания [22].

#### **Секвенирование нового поколения**

Метод секвенирования нового поколения (СНП) основан на применении консенсусного набора праймеров (не пациент-специфичных), который позволяет амплифицировать и в дальнейшем секвенировать все реаранжированные сегменты генов Ig в образце ( $\geq 10^5$ ). Метод показал применимость более чем в 90 % случаев с ММ и чувствительность не менее  $10^{-6}$ .

В дебюте заболевания детектируется клональная реаранжировка гена Ig, которая используется как мишень для нахождения признаков МОБ в образцах в последующих точках исследования [23, 24]. Частота встречаемости искомого клонотипа рассчитывается как число его последовательностей, деленное на общее число последовательностей в образце.

В работе Martínez-López и соавт. [23] 133 пациента были поделены на 3 группы: с высоким ( $\geq 10^{-3}$ ), средним ( $10^{-3} - 10^{-5}$ ) и низким ( $< 10^{-5}$ ) уровнями МОБ. Выделенные группы пациентов значительно отличались по времени до прогрессии заболевания (27, 48 и 80 мес соответственно).

Недостатком метода СНП является только относительная количественная оценка МОБ, т.е. доля клональной реаранжировки пересчитывается по отношению ко всем поликлональным перестройкам генов Ig и зависит от присутствия В-клеток, количество которых варьирует в зависимости от проведенного лечения. В таком случае доля остаточных клеток с клональной реаранжировкой может быть высокой, несмотря на низкое значение их абсолютного количества. Однако метод показал возможность оценки МОБ в периферической крови пациентов с ММ, что является малоинвазивным методом диагностики [25].

#### **Магнитно-резонансная томография всего тела, метод позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией**

Магнитно-резонансная томография (МРТ), позитронно-эмиссионная томография, совмещенная

с компьютерной томографией (ПЭТ/КТ) не являются методами детекции МОБ в привычном смысле. Однако вследствие высокой частоты экстрамедуллярных рецидивов чувствительные визуализирующие инструментальные методы позволяют переоценить полноту ремиссии [26].

МРТ всего тела является наиболее чувствительным неинвазивным визуализирующим методом детекции очагов в костях позвоночника, дает полную информацию о степени и характере повреждения мягких тканей и характере инфильтрации КМ (очаговая, диффузная и др.). Следует отметить, что в течение нескольких месяцев после терапии очаговые повреждения могут оставаться и визуализироваться у пациентов как с хорошим ответом, так и без ответа на терапию. Это связано с наличием реактивных (отек, гематома) и остаточных очагов, содержащих погибшие опухолевые клетки, что может вносить несоответствия между серологическим ответом и МРТ-опосредованной оценкой полноты ремиссии. Учитывая такие особенности, рекомендуется проводить МРТ с интервалом в 3 мес после окончания терапии [27].

Метод ПЭТ/КТ позволяет оценить метаболическую активность (захват)  $^{18}\text{F}$ -флюорозедоксиглюкозы (ФДГ) опухолевыми клетками в экстра- и интрамедуллярных очагах, локализовать их анатомически и распознать очаги остеодеструкции. Было показано, что сохранение аномального захвата ФДГ клетками после ВДХТ и / или аутоТСКК является неблагоприятным прогностическим фактором [28]. Среди 192 пациентов, получивших терапию талидомидом/дексаметазоном с последующей аутоТСКК и у которых сохранялось поражение тканей (подтвержденное методом ПЭТ/КТ), были короче ОВ и беспрогрессивная выживаемость (БПВ) [29]. В работе E. Zamagni и соавт. [30] с включением 192 пациентов было показано, что наличие очагов на ПЭТ-исследовании после ауто-ТСКК является значимым параметром и ОВ и время до прогрессии в ПЭТ-позитивных и ПЭТ-негативных группах больных значительно отличаются. Кроме того, 23 % пациентов, достигших ПР, вошли в ПЭТ-позитивную группу. Это свидетельствует о том, что с помощью ПЭТ можно определять более глубокую ремиссию. Однако этот метод может давать как ложно-положительные, так и ложно-отрицательные результаты в случае наличия инфекционных или воспалительных процессов [31]. Сравнение методов МРТ всего тела с ПЭТ/КТ показало, что ПЭТ/КТ имеет сходную с МРТ чувствительность, но более высокую специфичность.

#### **Многоцветная проточная цитометрия**

Многоцветная проточная цитометрия (МПЦ) – метод, основанный на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции отдельных клеток. Флуоресцентный сигнал появляется в случае связывания клетки с меченым флуорохромным красителем моноклональным антителом (МАТ), специфичным к белковым структурам клетки. С помощью

Таблица 3. Сравнительная характеристика основных методов детекции минимальной остаточной болезни

Table 3. Comparative characteristics of the minimal residual disease detection methods

Характеристики Characteristics	Многоцветная проточная цитометрия Multicolor flow cytometry	Аллель-специфичная полимеразная цепная реакция Allele-specific polymerase chain reaction	Секвенирование нового поколения Next generation sequencing
Применимость, % случаев множественной миеломы Applicability, % of MM cases	≈100 %	42–75 %	≈90 %
Необходимость в диагностическом (первичном) исследовании Necessity in diagnostic (primary) examination	Важно, но не обязательно Important, but not necessary	Обязательно Required	Обязательно Required
Время получения результата Time to obtained results	2–3 ч 2–3 hours	3–4 нед для идентификации мишени, для последующих точек – не менее 5 дней 3–4 weeks to identify of target, for subsequent points not less than 5 days	≥7 дней ≥7 days
Количественная оценка Quantitative assessment	Есть (прямая, точная) Yes (direct, exact)	Есть Yes	Есть Yes
Чувствительность Sensitivity	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	$10^{-5}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$
Необходимость в свежем образце Necessity of fresh sample	Обязательно (не более 48 ч) Required (no more than 48 hours)	Нет No	Нет No
Характеристика качества образца Sample quality characteristic	Есть Yes	Нет No	Нет No
Стандартизация метода Standardization of method	Нет окончательной стандартизации No final standardization	Есть Yes	Нет данных No data

МПЦ можно дифференцировать ПК от других ядродержащих клеток КМ и провести анализ экспрессируемых антигенов ПК в целях выявления неопластической популяции. Это позволяет использовать МПЦ как для инициальной диагностики ММ, так и для мониторинга МОБ (табл. 3). С помощью МПЦ появляется возможность подсчитать долю этих клеток от всех ПК и от всех ядродержащих клеток в образце.

К достоинствам этого метода исследования МОБ относятся: одновременная идентификация и характеристика одиночных миеломных ПК, исследование большого количества ядродержащих клеток в течение нескольких часов, количественная оценка МОБ [16, 19], комбинированное определение поверхностных и внутриклеточных маркеров и применимость метода в большинстве случаев с ММ. Кроме того, МПЦ позволяет оценить качество материала: констатация значительной примеси периферической крови в аспирате КМ помогает исключить ложноотрицательные результаты [32].

Актуальность проблемы, связанной с поиском МОБ и выявлением прогностической значимости

и влияния статуса МОБ на ОВ и БРВ, не подвергается сомнению. За последнее 10-летие количество публикаций, посвященных выявлению МОБ при ММ, возросло в 4 раза. Первое место по количеству занимают статьи, посвященные МПЦ (рис. 1).

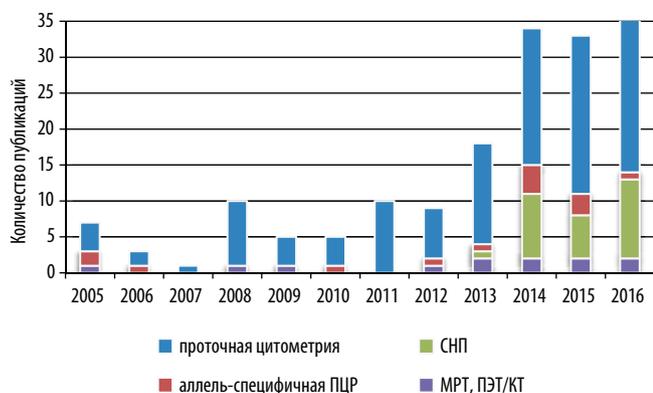
Далее нами будет подробно разобраны детали метода МПЦ как в мониторинге МОБ, так и в первичной диагностике ММ.

**Проточная цитометрия в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при множественной миеломе.** Роль метода МПЦ в диагностике моноклональных гаммапатий заключается в выполнении 3 задач:

1) первичной диагностики, основанной на подсчете числа ПК и определении доли фенотипически аномальных и / или моноклональных ПК;

2) идентификации прогностических факторов, в частности риска прогрессии моноклональной гаммапатии неясного генеза (МНГ) и бессимптомной ММ на основе доли аномальных и нормальных ПК;

3) количественного определения МОБ, используемого для оценки эффективности лечения и прогноза исхода заболевания [5, 33].



**Рис. 1.** Количество публикаций, в том числе обзорных статей, посвященных мониторингу минимальной остаточной болезни при множественной миеломе методами многоцветной проточной цитометрии и аллель-специфичных олигонуклеотидов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирования нового поколения (СНП), а также с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) и позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной (ПЭТ/КТ), с 2005 по 2016 г. (учитывались статьи, представленные в электронной базе данных PubMed)

**Fig. 1.** The number of publications, including review articles, related to minimal residual disease monitoring in multiple myeloma patients using the multicolor flow cytometry, allelespecific oligonucleotides by polymerase chain reaction (PCR), new generation sequencing (NGS) and with the use of magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography, combined with computed tomography (PET/CT) methods from 2005 to 2016 (only articles presented in the electronic database PubMed)

**Первичная диагностика множественной миеломы с помощью метода многоцветной проточной цитометрии.** Первичная диагностика ММ включает обязательный подсчет ПК в мазке аспирата КМ и в трепанобиоптате с помощью иммуногистохимического исследования. Показано, что процент ПК, подсчитанный в трепанобиоптате, выше, чем подсчитанный в мазке КМ, что связано с фиброзом и адгезией ПК, препятствующих аспирации миеломных клеток. Доля ПК, определенная с помощью МПЦ, как правило, на порядок ниже, чем доля ПК и в мазке КМ, и в биоптате. Это связано, во-первых, с тем, что ПК начинают крайне быстро погибать после разобщения их со стромой КМ [34], и, во-вторых, со значительным разведением образца кровью вследствие того, что в большинстве центров 1-я порция КМ используется для мазков, для цитометрического же исследования берут 2-ю или даже 3-ю порцию КМ [33, 35].

Имунофенотипирование ПК помогает в диагностике редких случаев IgM-варианта ММ, несекретирующей формы ММ и первичного амилоидоза [33].

Следует принять во внимание, что значительная доля аномальных ПК (более 97 % от всех ПК в КМ) характерна для ММ, меньшее их количество (менее 97 %) может соответствовать МГНГ, хотя окончательный диагноз зависит от морфологического исследования и клинических признаков [33]. У пациентов с МГНГ в большинстве (>80 %) случаев доля нормальных клеток превышает 5 %. У пациентов с симптоматической формой ММ лишь в небольшом проценте

случаев (<15 %) обнаруживается более 5 % нормальных ПК [36].

Дополнительной задачей первичной диагностики ММ является определение aberrантного иммунофенотипа, а именно сочетания аномально-экспрессирующихся поверхностных антигенов, которое может в дальнейшем облегчить и улучшить поиск остаточных миеломных клеток.

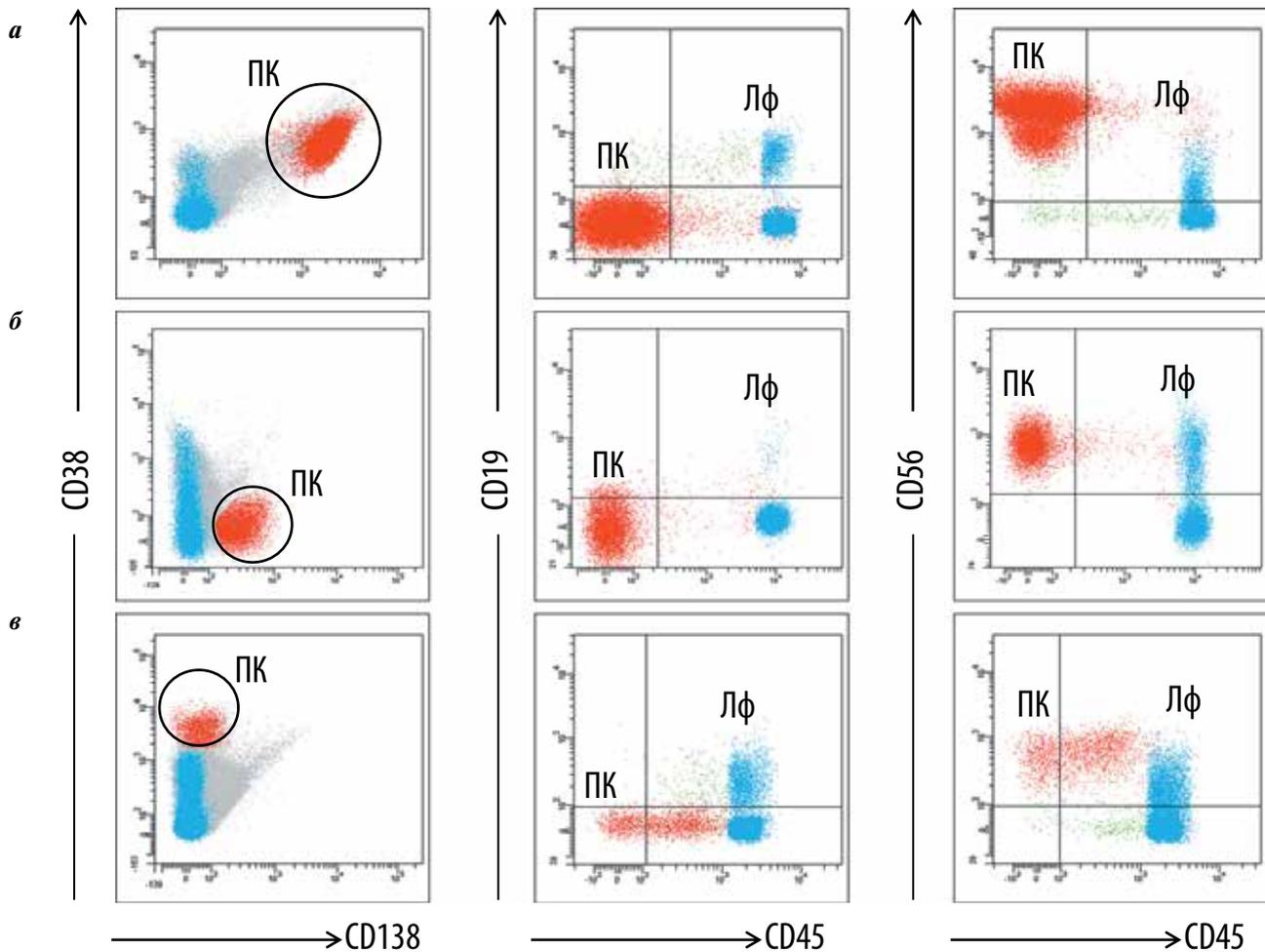
**Идентификация прогностических факторов, в частности риска прогрессии моноклональной гаммапатии неясного генеза и бессимптомной множественной миеломы, на основе доли аномальных и нормальных плазматических клеток.** Для пациентов с МГНГ и бессимптомной формой ММ с высоким соотношением аномальных к нормальным ПК характерен высокий риск прогрессии в ММ [37, 38].

Показано, что, в случае если доля нормальных ПК по отношению ко всем ПК не более 5 %, вероятность прогрессирования в симптоматическое заболевание в течение 5 лет у пациентов с МГНГ и тлеющей ММ выше и составляет 25 % (против 5 %,  $p < 0,001$ ) и 64 % (против 8 %,  $p < 0,001$ ) соответственно. Пациенты с симптоматической ММ, у которых доля нормальных ПК превышает 5 %, имеют более высокий уровень гемоглобина (121 г/л против 106 г/л,  $p < 0,001$ ), низкий процент ПК в КМ (2 % против 13 %,  $p < 0,001$ ) и более низкую концентрацию М-компонента (20 г/л против 40 г/л,  $p < 0,001$ ) [39].

**Имунофенотипирование плазматических клеток.** Основой применения МПЦ в первичной диагностике ММ и МОБ является возможность детектирования аномальных ПК. Неопластические ПК идентифицируются по рестрикции легких цепей Ig, а также по специфическому сочетанию aberrантной экспрессии поверхностных антигенов.

Первым этапом иммунофенотипического анализа является идентификация ПК. Наилучшим способом решения данной задачи служит одновременное использование маркеров CD138, CD38 и CD45 в комбинации с показателями светорассеяния. CD138 (синдекан-1) — это специфический маркер ПК, который экспрессируется и на миеломных, и на нормальных ПК. Однако на плазмобластах (незрелых ПК) экспрессия CD138 менее интенсивна или отсутствует. CD38 — это неспецифический маркер, который экспрессируется на многих лейкоцитах, но наибольшая плотность его экспрессии обнаруживается на ПК [40].

Встречаются редкие случаи ММ, при которых ПК имеют «омоложенный» иммунофенотип CD138dim (dim — низкая плотность экспрессии антигена)/CD45<sup>+</sup> или плазмобластный иммунофенотип CD138<sup>-</sup>/CD45<sup>++</sup> [41]. Описаны крайне редкие случаи ММ с отсутствием CD38 на ПК [42]. Нам встретились случаи отсутствия на ПК и CD138, и CD38, при этом ПК также имели аномальную экспрессию CD56, на них отсутствовал маркер CD19, экспрессия CD45 была вариабельной, клональность клеток была подтверждена



**Рис. 2.** Экспрессия антигенов CD138 и CD38 на плазматических клетках (ПК) при множественной миеломе. Лимфоциты (Лф) представлены на диаграммах в качестве внутреннего контроля для маркеров CD19 и CD56: а – миеломные ПК с иммунофенотипом CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; б – миеломные ПК с отсутствием CD38, иммунофенотип: CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; в – ПК при ММ с «омоложенным» иммунофенотипом CD138<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>

**Fig. 2.** CD138 and CD38 antigens expression on PC in MM patients. Lymphocytes are represented in the diagrams as an internal control for CD19 and CD56: а – myeloma PC with immunophenotype CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; б – myeloma PC with absence of CD38 and immunophenotype: CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; в – myeloma PC with immunophenotype CD138<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>.

по рестрикции легких цепей Ig (рис. 2). Потеря CD138 и CD38 миеломными клетками может происходить в ходе лечения [43]. Также есть данные, что отсутствие CD138 на ПК может быть связано с гипоксией клеток [44].

Определение клональности ПК важно для первичной диагностики ММ, что позволяет дифференцировать моноклональные неопластические ПК от поликлональных реактивных клеток со схожим иммунофенотипом. Однако определение клональности при оценке МОБ имеет меньшую практическую значимость. Это связано с тем, что большая часть ПК после лечения – нормальные и являются поликлональными, поэтому исследование лишь цитоплазматических κ- и λ-легких цепей иммуноглобулинов без изучения поверхностных маркеров не позволит достоверно оценить наличие МОБ [33].

Нет универсального поверхностного маркера, который позволил бы провести дифференцировку

аномальных и нормальных ПК. Существует список наиболее информативных маркеров, аномальная экспрессия которых встречается при ММ (табл. 4).

**Рекомендации к подготовке проб и проведению анализа.** Для первичной диагностики ММ и мониторинга МОБ исследуют аспират КМ. В качестве антикоагулянтов допустимо применение этилендиаминтетрауксусной кислоты и гепарина натрия. Использование цитрата натрия снижает жизнеспособность клеток, что нежелательно. Максимальное время хранения образцов составляет 48 ч от момента взятия материала. Приемлемым считается хранение как при комнатной температуре, так и при 4–8 °С. К признакам сомнительного качества образцов относятся гемолиз, наличие сгустков, большой объем аспириата КМ, свидетельствующий о чрезмерном разведении периферической кровью (>2 мл), и исследования такого материала необходимо избегать [46].

**Таблица 4.** Список наиболее информативных антигенов для детекции aberrantных плазматических клеток при множественной миеломе (адаптировано из [45])

**Table 4.** List of the most informative antigens for detection of aberrant plasma cells in multiple myeloma (adapted from [45])

Антиген Antigen	Профиль нормальной экспрессии плазматических клеток костного мозга Profile of normal expression in bone marrow plasma cells	Профиль аномальной экспрессии Profile of abnormal expression	Доля аномальной экспрессии среди случаев множественной миеломы, % The proportion of abnormal expression among multiple myeloma cases, %
CD38	Высокая плотность экспрессии (high) High density of expression (high)	Положительная, но плотность экспрессии ниже (dim) Positive, but the expression density is lower (dim)	80
CD45	Гетерогенная – от отрицательной (до 6 %) до положительной Heterogeneous – from negative (<6 %) to positive	Отрицательная Negative	80
CD19	Положительная (но до 33 % от всех ПК могут быть CD19 <sup>-</sup> ) Positive (but up to 33 % of all PCs can be CD19 <sup>-</sup> )	Отрицательная Negative	96
CD56	Отрицательная (но до 10–15 % могут быть CD56dim) Negative (but up to 10–15 % can be CD56dim)	Высокая плотность экспрессии High density of expression	60–75
CD117	Отрицательная (0 %) Negative (0 %)	Положительная Positive	30–32
CD20	Отрицательная (но до 4 % CD20dim) Negative (but up to 4 % CD20dim)	Положительная Positive	17–30
CD28	Отрицательная (но до 15 % CD28dim) Negative (but up to 15 % CD28dim)	Высокая плотность экспрессии High density of expression	15–45
CD27	Яркая (100 %) Positive (100 %)	Слабая/отрицательная Low/negative	40–68
CD81	Положительная (100 %) Positive (100 %)	Слабая/отрицательная Low/negative	55
CD200	Слабоположительная Weakly positive	Высокая плотность экспрессии High density of expression	≥70
CD33	Отрицательная (но до 6 % CD33dim) Negative (but up to 6 % CD33dim)	Слабая/положительная Low/positive	18

Для выделения лейкоцитов рекомендуется до окрашивания проводить лизис эритроцитов с помощью раствора с хлоридом аммония. Выделение мононуклеаров с помощью центрифугирования в градиенте плотности с использованием фикола не рекомендуется, так как это может привести к вариабельному увеличению или уменьшению доли ПК, кроме того, фиколл ускоряет потерю CD38 и CD138 с поверхности ПК, что ухудшает дальнейший процесс анализа данных [47, 48].

По рекомендациям M. Stetler-Stevenson и соавт. [48] при конструировании панели для детекции МОБ в каждую пробирку должны быть включены МАТ к антигенам дифференцировки CD19, CD38, CD45 и CD138 и проанализированы маркеры CD27, CD56, CD81 и CD117. Нужно заметить, что исследование рестрикции внутриклеточных легких цепей иммуноглобулинов в 97 % случаев не дает дополнительной

полезной информации, поэтому для рутинной диагностики проводить его не рекомендуется. Однако соотношение κ/λ может помочь в прояснении атипичных случаев, когда анализ только поверхностных маркеров вызывает затруднения в интерпретации данных, при этом рестрикция легких цепей оценивается в выбранной потенциально аномальной фракции ПК. Надежная панель МАТ для 6-цветной проточной цитометрии, показавшая эффективность в крупномасштабных клинических испытаниях (Myeloma IX, X и первые 2000 пациентов в Myeloma XI), указана в табл. 5.

Наиболее часто встречаемые aberrации поверхностных антигенов при ММ включают: отрицательную экспрессию CD45 и CD19, высокую плотность экспрессии CD56 и сниженную экспрессию CD38. Оценка комбинации только этих маркеров позволяет идентифицировать аномальные ПК более чем в 90 % случаев ММ [39].

**Таблица 5.** Панель моноклональных антител для мониторинга минимальной остаточной болезни при множественной миеломе для 6-цветного проточного цитометра

**Table 5.** Monoclonal antibodies panel for monitoring a minimal residual disease in multiple myeloma patients for a 6-color flow cytometer

№ пробирки	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PC7	APC	APC-C750
1-я	CD27	CD56	CD19	CD38	CD138	CD45
2-я	CD81	CD117	CD19	CD38	CD138	CD45

**Примечание.** Здесь и в табл. 6: APC – аллофикоцианин, APC-C750 – аллофикоцианин-цианин 750, Cy7 – цианин 7, Cy5.5 – цианин 5.5, FITC – флюоресцеинизотиоцианат, PE – фикоэритрин, PerCP – перидинин-хлорофилл протеин.

**Note.** Here and in table 6: APC – allophycocyanin, APC-C750 – allophycocyanin-cyanine 750, Cy7 – cyanine 7, Cy5.5 – cyanine 5.5, FITC – fluoresceinisothiocyanate, PE – R-phycoerythrin, PerCP – peridinin-chlorophyll protein.

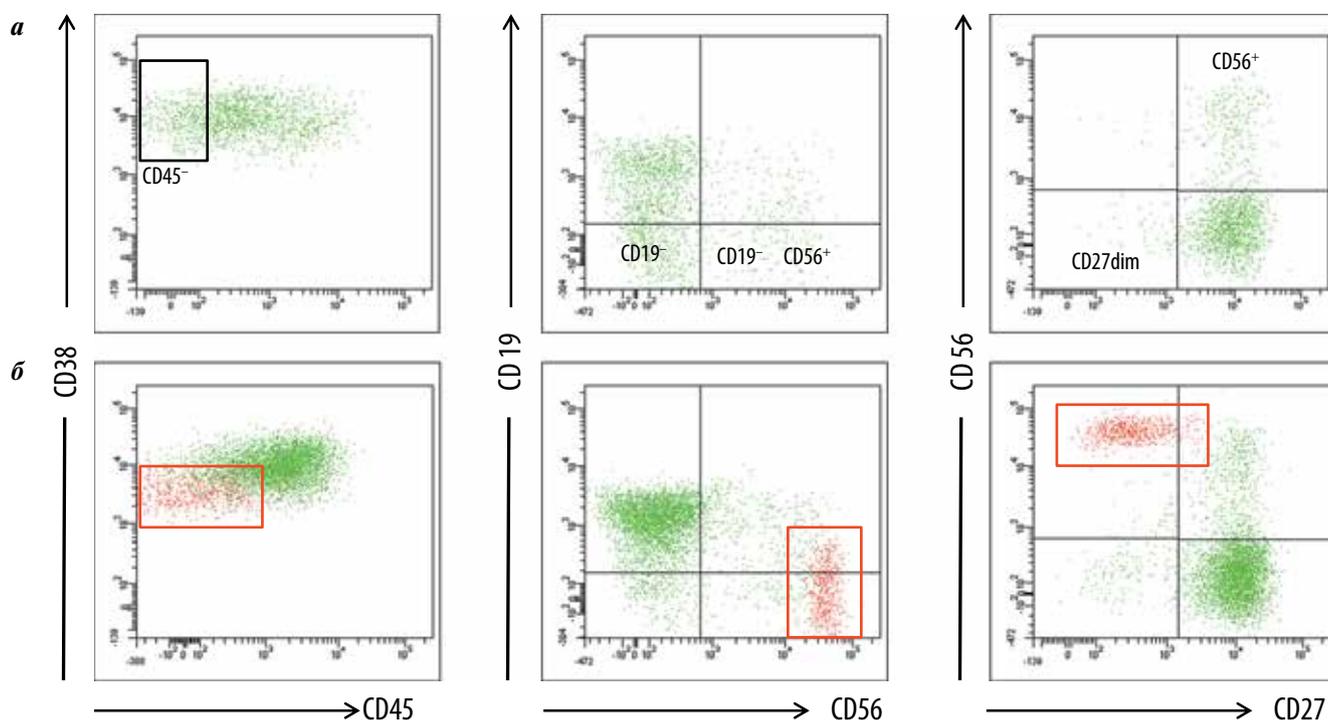
Однако при анализе большого количества ядродержащих клеток (>1 млн) показано, что ПК здоровых доноров могут быть CD19<sup>-</sup> и / или CD56<sup>+</sup> со сниженной экспрессией CD45, а также гетерогенны по экспрессии CD28 [48, 49]. С другой стороны, аномальные клетки обладают более гомогенной экспрессией антигенов, могут иметь сниженную экспрессию CD81, CD27 и экспрессировать CD117, что никогда не наблюдается на нормальных ПК. Исследование этих дополнительных, более специфичных антигенов помогает улучшить дифференциацию нормальных и миеломных ПК. Для того чтобы утверждать, что найденная популяция ПК аномальна, необходимо наличие на данных клетках не менее 2 aberrантно-экспрессируемых маркеров [48].

Анализ большого количества клеток является важным моментом в оценке МОБ. В руководстве EMN (The European Myeloma Network) 2008 указана достаточная клинически значимая чувствительность – 0,01 % [33]. Для достижения такой чувствительности необходимо проанализировать не менее 500 тыс. ядродержащих клеток КМ, считая минимальной популяцией аномальных ПК 30–50 клеток с aberrантным иммунофенотипом. Однако появляются новые данные о том, что применение новых высокоэффективных протоколов лечения ведет к снижению МОБ до значений менее 0,01 %. Для повышения чувствительности метода МПЦ до 0,001 % необходимо увеличение количества анализируемых ядродержащих клеток до 3–5 млн, но это может привести к затруднениям, связанным с уменьшением специфичности. В таком случае увеличивается число нормальных ПК, иммунофенотип которых «пересекается» с аномальным фенотипом миеломных клеток: CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>/low, CD20<sup>+</sup>, CD27low, CD28<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD200bright [50] (рис. 3). Поэтому проведение высокочувствительного и специфичного анализа возможно только при применении не менее чем 8-цветной проточной цитометрии [45].

Панель для 8-цветной проточной цитометрии разработана Euroflow Consortium (табл. 6). Пробирка № 2 исследуется, если необходимо подтвердить клональность ПК с фенотипическими отклонениями.

Заключение по оценке МОБ должно включать: долю всех ПК от ядродержащих клеток, долю ПК с aberrантным иммунофенотипом от всех ПК, а также уровень чувствительности, достигнутый при анализе. Если среди всех просчитанных ядродержащих клеток удалось обнаружить более 50 миеломных клеток, то делается заключение о наличии МОБ, при этом указывается процент обнаруженных аномальных ПК от всех ядродержащих клеток. Если обнаружены 30–50 миеломных клеток, то делается заключение о наличии МОБ, однако точная количественная оценка не может быть дана, так как достигнут предел детекции МОБ (30 aberrантных клеток), но не достигнут предел воспроизводимого подсчета (50 миеломных клеток). Если в образце не найдено даже 30 миеломных клеток, для того чтобы дать заключение об отсутствии МОБ, необходимо оценить качество образца КМ, а именно степень разведения периферической кровью. К признакам значительного разведения КМ кровью относятся: отсутствие или низкое содержание нормальных ПК, В-клеточных и миелоидных предшественников, тучных клеток, эритрокариобластов. Сильно разведенный периферической кровью КМ является неадекватным материалом для оценки МОБ, поэтому данная информация также должна отражаться в заключении [48].

**Исследование прогностической значимости минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии в разных протоколах терапии множественной миеломы.** Прогностическая значимость оценки наличия МОБ показана в крупных клинических исследованиях. В исследовании испанской группы PETHEMA с включением 295 пациентов, которые получали терапию по протоколу GEM2000 (ВДХТ с последующей аутоТСКК), оценка МОБ проводилась на 100-й день после проведения аутоТСКК. БПВ у МОБ-негативных пациентов была выше, чем у МОБ-позитивных (медиана 71 мес против 37 мес,  $p < 0,001$ ), как и ОВ (медиана не достигнута против 89 мес,  $p = 0,002$ ). В данном исследовании использовали 4-цветную проточную цитометрию с уровнем чувствительности по крайней мере 0,01 % [51].



**Рис. 3.** Экспрессия антигенов CD38, CD19, CD56, CD45 на нормальных и миеломных плазматических клетках (ПК): а – ПК здорового донора: минорные субпопуляции ПК с иммунофенотипом CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD27dim, «имитирующим» иммунофенотип миеломных клеток; б – на фоне нормальных выделены ПК, формирующие остаточную популяцию с aberrantным иммунофенотипом CD38dim/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD27dim

**Fig. 3.** CD38, CD19, CD56 and CD45 antigens expression on normal and myeloma PC: а – PC of healthy donor: minor PC subpopulations with immunophenotype CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD27dim, "simulating" the immunophenotype of myeloma cells; б – Among normal PCs, PCs that form a residual population with an aberrant immunophenotype CD38dim/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD27dim are isolated

**Таблица 6.** Панель моноклональных антител для детекции минимальной остаточной болезни при множественной миеломе для 8-цветной проточной цитометрии

**Table 6.** Monoclonal antibodies panel for detection of a minimal residual disease in multiple myeloma patients

№ пробирки	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PC7	APC	APC-C750	V450	BV510
1-я	CD38 (клон L38)	CD56 (клон C5.9)	CD45 (клон HI30)	CD19 (клон J3-119)	CD117 (клон 104D2)	CD81 (клон M38,)	CD138 (клон MI15)	CD27 (клон O323)
2-я	CD38 (клон L38)	CD56 (клон C5.9)	CD45 (клон HI30)	CD19 (клон J3-119)	cIgк (поликло- нальные, Dako)	cIgλ (поликло- нальные, Dako)	CD138 (клон MI15)	CD27 (клон O323)

**Примечание.** V450 – краситель violet 450, BV510 – краситель brilliant violet 510.

*Note.* V450 – violet 450, BV510 – brilliant violet 510.

По результатам исследования Medical Research Council Myeloma IX, отсутствие МОБ на 100-й день после аутоТСКК (с предшествующей ВДХТ) является благоприятным признаком. БПВ и ОВ у пациентов с МОБ-негативным статусом длительнее, чем у пациентов с выявленной МОБ (БПВ: 28,6 мес против 15,5 мес,  $p < 0,001$ ; ОВ: 80,6 мес против 59 мес,  $p = 0,018$ ) [52].

В работе Rawstron и соавт. [52] показано, что среди пациентов, получавших неинтенсивную индукцион-

ную терапию по 2 различным режимам, 14,5 % достигли МОБ-негативного статуса. В то же время были выявлены различия между лечением с помощью режима МР (мелфалан и преднизолон) и СТДа (циклофосфамид, талидомид, дексаметазон, ослабленный режим). Доля МОБ-негативных пациентов, получавших терапию МР, была ниже, чем доля получавших СТДа (3 % против 26 %,  $p < 0,001$ ) [52].

При применении интенсивных режимов терапии у 19 % пациентов в конце фазы индукции МОБ отсутст-

вовала; при применении режима СТД (циклофосфамид, талидомид, дексаметазон) МОБ-негативных пациентов было 25 %, при применении CVAD (циклофосфамид, винкристин, доксорубин, дексаметазон) — 13 % ( $p = 0,004$ ). После проведения аутоТСКК доля пациентов с недетектируемой МОБ составила 62,2 %. Также были обнаружены значимые отличия в наличии МОБ после аутоТСКК (100-й день) при сравнении 2 индукционных режимов: МОБ-негативны были 71 % пациентов, леченных по режиму СТД, и только 54 % среди пациентов, получавших CVAD ( $p < 0,001$ ) [52].

Применение поддерживающей терапии талидомидом после проведения ВДХТ и аутоТСКК позволяет достигнуть и сохранить МОБ-негативный статус. Среди пациентов, которые имели МОБ на 100-й день после аутоТСКК, МОБ-негативного статуса достигли 27,6 % получавших поддерживающую терапию и 3,4 % не получавших ее ( $p = 0,025$ ). Среди пациентов, которые не имели МОБ на 100-й день после аутоТСКК, МОБ-негативный статус сохранили 96 % получавших поддерживающую терапию и 68,8 % не получавших ее ( $p = 0,026$ ). В исследовании Myeloma IX использовали 6-цветную проточную цитометрию с чувствительностью 0,01 % (обнаруживали 30–50 миеломных клеток, составляющих дискретную популяцию, на 500 тыс. ядродержащих клеток КМ) [52].

В исследовании Intergroupe Francophone du Myelome МОБ-негативного статуса по окончании курса достигли 68 % пациентов, при этом ни у кого из них в течение 3 лет не зарегистрировано рецидива (100 % БРВ). В данном исследовании использовали 7-цветную проточную цитометрию с чувствительностью

0,0025 % (минимум 50 aberrantных клеток на 2 млн ядродержащих клеток) [53].

### Заключение

Новые подходы в терапии ММ улучшили эффективность проводимого лечения, что привело к удлинению общей и безрецидивной выживаемости у пациентов с ММ, а также увеличили частоту достижения ПР. Стандартные подходы к оценке ремиссии (морфологическое и иммунохимическое исследования) не позволили выявить достоверные отличия между группами пациентов с ПР и сПР по таким параметрам, как ОВ и БРВ. Было показано, что у 1/3 больных, достигших ПР, развивается рецидив. Это обусловлено наличием МОБ — состояния, при котором в крайне низком количестве персистирует популяция опухолевых клеток, способная в дальнейшем привести к развитию рецидива. Несмотря на высокую частоту применимости МПЦ в диагностике и мониторинге МОБ при ММ, данный метод является нестандартизованным, а его чувствительность и специфичность зависят от используемой панели мАТ, проточных цитометров с разными характеристиками и выбранных стратегий гейтирования. Увеличение количества анализируемых антигенов, использование по крайней мере 8-цветной проточной цитометрии позволяет провести высокоспецифичный и точный анализ с чувствительностью около 0,001 %.

Показано, что клиренс остаточных клеток у больных ММ потенциально достижим и является важным независимым прогностическим фактором. В перспективе исследование МОБ в рамках определенных протоколов лечения может помочь в принятии адекватных решений на этапе поддерживающей терапии после ВДХТ.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2014;136(5):e359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210. PMID: 25220842.
2. Rajkumar S., Kyle R. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005;80(10):1371–82. DOI: 10.4065/80.10.1371. PMID: 16212152.
3. Rajkumar S., Kumar S. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2016;91(1):101–19. DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.11.007. PMID: 26763514.
4. Rajkumar S., Dimopoulos M., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538–48. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70442-5. PMID: 25439696.
5. Durie B., Harousseau J., Miguel J. et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20(9):1467–73. DOI: 10.1038/sj.leu.2404284. PMID: 16855634.
6. Kumar S., Rajkumar S., Dispenzieri A. et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516–20. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129. PMID: 17975015.
7. Rajkumar S. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol* 2015;91(1):90–100. DOI: 10.1002/ajh.24236. PMID: 26565896.
8. Palumbo A., Cavallo F., Gay F. et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2014;371(10):895–905. DOI: 10.1056/nejmoa1402888. PMID: 25184862.
9. Sonneveld P., Goldschmidt H., Rosinol L. et al. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation

- in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol* 2013;31(26):3279–87. DOI: 10.1200/jco.2012.48.4626. PMID: 23897961.
10. Rajkumar S., Harousseau J., Durie B. et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011;117(18):4691–95. DOI: 10.1182/blood-2010-10-299487. PMID: 21292775.
  11. Chee C., Kumar S., Larson D. et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood* 2009;114(13):2617–8. DOI: 10.1182/blood-2009-01-198788. PMID: 19641191
  12. Kyrtonis M., Vassilakopoulos T., Kafasi N. et al. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;137(3):240–3. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06561.x. PMID: 17408464.
  13. Martínez-López J., Paiva B., Lopez-Anglada L. et al. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood* 2015;126(7):858–62. DOI: 10.1182/blood-2015-04-638742. PMID: 26089396.
  14. Lopez-Anglada L., Cueto-Felgueroso C., Mateos M.V. et al. Usefulness of Serum-Free-Light-Chains-Ratio (SFLCR) and Serum Heavy-Light-Chains-Ratio (SHLCR) in multiple myeloma in the context of three GEM / Pethema clinical trials. *Blood* 2015; 126(23), 2962. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/2962>
  15. Paiva B., Martínez-López J., Vidriales M. et al. Comparison of Immunofixation, Serum Free Light Chain, and Immunophenotyping for Response Evaluation and Prognostication in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 2011; 29(12):1627–33. DOI: 10.1200/jco.2010.33.1967. PMID: 21402611.
  16. Paiva B., Gutierrez N., Rosinol L. et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustainable complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2011;119(3):687–91. DOI: 10.1182/blood-2011-07-370460. PMID: 22128143
  17. Kuiper R., van Duin M., van Vliet M. et al. Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System. *Blood* 2015;126(17):1996–2004. DOI: 10.1182/blood-2015-05-644039. PMID: 26330243.
  18. Fonseca R., Bergsagel P., Drach J. et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210–21. DOI: 10.1038/leu.2009.174. PMID: 19798094.
  19. Puig N., Sarasquete M., Balanzategui A. et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* 2013;28(2):391–7. DOI: 10.1038/leu.2013.217. PMID: 23860448.
  20. Sarasquete M.E., García-Sanz R., González D. et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005; 90(10),1365–72. PMID: 16219573.
  21. Silvennoinen R., Lundan T., Kairisto V. et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2014;4(10):250. DOI: 10.1038/bcj.2014.69. PMID: 25303369
  22. Fulciniti M., Munshi N., Martínez-López J. Deep Response in Multiple Myeloma: A Critical Review. *Biomed Res Int* 2015;2015:1–7. DOI: 10.1155/2015/832049. PMID: 26783530.
  23. Martínez-López J., Lahuerta J., Pepin F. et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;123(20):3073–9. DOI: 10.1182/blood-2014-01-550020. PMID: 24646471.
  24. Faham M., Zheng J., Moorhead M. et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012;120(26):5173–80. DOI: 10.1182/blood-2012-07-444042. PMID: 23074282.
  25. Kord N., Mailankody S., Roschewski M. et al. Minimal residual disease (MRD) testing in newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients: a prospective head-to-head assessment of cell-based, molecular, and molecular-imaging modalities. *Blood* 2014; 124(21):2105.
  26. Dimopoulos M., Terpos E., Comenzo R.L. et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia* 2009; 1545–56. DOI: 10.1038/leu.2009.89. PMID: 19421229.
  27. Hillengass J., Ayyaz S., Kilk K. et al. Changes in magnetic resonance imaging before and after autologous stem cell transplantation correlate with response and survival in multiple myeloma. *Haematologica* 2012;97(11):1757–60. DOI: 10.3324/haematol.2012.065359. PMID: 22689673.
  28. Usmani S., Mitchell A., Waheed S. et al. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3. *Blood* 2013;121(10):1819–23. DOI: 10.1182/blood-2012-08-451690. PMID: 22689673.
  29. Caers J., Withofs N., Hillengass J. et al. The role of positron emission tomography-computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma. *Haematologica* 2014;99(4):629–37. DOI: 10.3324/haematol.2013.091918. PMID: 24688111.
  30. Zamagni E., Patriarca F., Nanni C. et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood* 2011;118(23):5989–95. DOI: 10.1182/blood-2011-06-361386. PMID: 21900189.
  31. Bartel T., Haessler J., Brown T. et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 2009;114(10):2068–76. DOI: 10.1182/blood-2009-03-213280. PMID: 19443657.
  32. Loken M., Chu S., Fritschle W. et al. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry* 2009;76B(1):27–36. DOI: 10.1002/cyto.b.20429. PMID: 18548614.
  33. Rawstron A., Orfao A., Beksac M. et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93(3):431–8. DOI: 10.3324/haematol.11080. PMID: 18268286.
  34. Hartmann L., Biggerstaff J., Chapman D. et al. Detection of genomic abnormalities in multiple myeloma: the application of FISH analysis in combination with various plasma cell enrichment techniques. *Am J Clin Pathol* 2011;136(5):712–20. DOI: 10.1309/ajcpf7nflw8uajep. PMID: 22031309.
  35. Ely S., Biran N., Chari A. What we mean when we talk about MRD in myeloma. A review of current methods. Part 1 of a two-part series. *Curr Hematol Malig Rep* 2014;9(4):379–88. DOI: 10.1007/s11899-014-0238-x. PMID: 25277219.
  36. Paiva B., Vidriales M., Mateo G. et al. The persistence of immunophenotypically

- normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009;114(20):4369–72.  
DOI: 10.1182/blood-2009-05-221689.  
PMID: 19755674.
37. Rawstron A.C., Fenton J.A.L., Gonzalez D. et al. High-risk MGUS: Identification by immunophenotype, karyotype, and clonal homogeneity. *Blood* 2003;102(11):36A–7A.
38. Perez-Persona E., Vidriales M., Mateo G. et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110(7):2586–92.  
DOI: 10.1182/blood-2007-05-088443.  
PMID: 17576818.
39. Paiva B., Almeida J., Pérez-Andrés M. et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry* 2010; 239–52.  
DOI: 10.1002/cyto.b.20512.  
PMID: 20155853.
40. Rihova L., Muthu Raja K., Calheiros Leite L. et al. Immunophenotyping in Multiple Myeloma and Others Monoclonal Gammopathies. In: *Multiple Myeloma – A Quick Reflection on the Fast Progress*. Ed. R. Hajek. Epub: 2013.  
DOI: 10.5772/55938.
41. Reid S., Yang S., Brown R. et al. Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol* 2010;32(6 Pt 1):e190–6.  
DOI: 10.1111/j.1751-553x.2010.01222.x.  
PMID: 20201998.
42. Bataille R., Jégo G., Robillard N. et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006; 91(9), 1234–40.  
PMID: 16956823.
43. Ise M., Matsubayashi K., Tsujimura H., Kumagai K. Loss of CD38 Expression in Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2016; 16(5): 59–64.  
DOI: 10.1016/j.clml.2016.02.037.  
PMID: 26997107.
44. Kawano Y. Hypoxia reduces CD138 expression and induces an immature and stem cell-like transcriptional program in myeloma cells. *Int J Oncol* 2013; 43(6):1809–16.  
DOI: 10.3892/ijo.2013.2134.  
PMID: 24126540.
45. Flores-Montero J., de Tute R., Paiva B. et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry* 2015;90(1):61–72.  
DOI: 10.1002/cyto.b.21265.  
PMID: 26100534.
46. Stetler-Stevenson M., Davis B., Wood B., Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry* 2007;72B(S1):S3.  
DOI: 10.1002/cyto.b.20362.  
PMID: 17803189.
47. Kumar S., Kimlinger T., Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23(3):433–51.  
DOI: 10.1016/j.beha.2010.09.002.  
PMID: 21112041.
48. Stetler-Stevenson M., Paiva B., Stoolman L. et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry* 2015;90(1):26–30.  
DOI: 10.1002/cyto.b.21249.  
PMID: 25907102.
49. Peceliunas V., Janiulioniene A., Matuzeviciene R., Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry* 2011;80(5):318–23.  
DOI: 10.1002/cyto.b.20601.  
PMID: 21634008.
50. Liu D., Lin P., Hu Y. et al. Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012;65(9):823–9.  
DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200881.  
PMID: 22685235.
51. Paiva B., Vidriales M., Cervero J. et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112(10):4017–23.  
DOI: 10.1182/blood-2008-05-159624.  
PMID: 18669875.
52. Rawstron A., Child J., de Tute R. et al. Minimal Residual Disease Assessed by Multiparameter Flow Cytometry in Multiple Myeloma: Impact on Outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 2013;31(20):2540–7.  
DOI: 10.1200/jco.2012.46.2119.  
PMID: 23733781.
53. Roussel M., Lauwers-Cances V., Robillard N. et al. Front-Line Transplantation Program With Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Combination As Induction and Consolidation Followed by Lenalidomide Maintenance in Patients With Multiple Myeloma: A Phase II Study by the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol* 2014; 32(25):2712–7.  
DOI: 10.1200/jco.2013.54.8164.  
PMID: 25024076.